
„Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie“

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Anästhesiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Dr. med. Christian Lehmann
geboren am 3. Mai 1964 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Eingereicht am: 28.11.2000

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. H. Van Aken, Münster
2. Prof. Dr. med. E. Martin, Heidelberg

Abstrakt

Die Störung der intestinalen Mikrozirkulation gilt als ein kardinaler Mechanismus für die Entwicklung des Multiorganversagens bei Sepsis. Da das Intestinum für mikrozirkulatorische Studien klinisch kaum zugänglich ist, wurden die Auswirkungen einer Therapie mit den antioxidativen Substanzen Oxypurinol und U-74389G (Lazaroid) bzw. den vasoaktiven Substanzen Iloprost (Prostacyclin-Analogon) und Dopexamin auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung in einem Tiermodell mit moderater und hoher Endotoxin-Belastung untersucht.

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Kapillarperfusion in der Muskularisschicht bei Endotoxinämie erbrachte eine Verbesserung durch Oxypurinol- und Dopexamingabe. Die Perfusion der Mukosa konnte vor allem durch eine Iloprostapplikation gesteigert werden. Die Endotoxin-induzierte, intestinale Leukozytenadhärenz wurde insbesondere durch die Behandlung mit den antioxidativen Substanzen vermindert.

Beide therapeutischen Optionen bewirkten eine ca. 60 %ige Reduktion der initialen Tumornekrosefaktor-alpha-Freisetzung in der Versuchsreihe mit der niedrigeren Endotoxin-Dosis. Parallel dazu konnte anhand von Malondialdehyd-Analysen gezeigt werden, dass Oxypurinol und U-74389G wirksam die intestinale, Radikal-induzierte Lipidperoxidation verringerten.

Der intestinale mikrovaskuläre Blutfluss konnte durch beide vasoaktiven Substanzen - sowohl bei moderater als auch bei erhöhter Endotoxin-Dosierung - signifikant gesteigert werden.

Die Ergebnisse beider Teilstudien bestätigten, dass sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch eine inadäquate Perfusion in der Mikrozirkulation wesentliche pathogenetische Faktoren bei Endotoxinämie bzw. Sepsis darstellen und entsprechende Therapieformen indiziert und effektiv sind. Eine kombinierte Gabe beider Substanzklassen erscheint daher sinnvoll und sollte in weiteren tierexperimentellen und klinischen Studien evaluiert werden.

Schlüsselwörter:

Endotoxin, Sepsis, Darm, Antioxidantien, Oxypurinol, Lazaroide, Dopexamin, Iloprost, Intravitalmikroskopie, Laser-Doppler-Flowmetrie, Tumornekrosefaktor alpha, Malondialdehyd, Tierversuch, Ratte

Abstract

The disturbance of the intestinal microcirculation is regarded as a pivotal mechanism in the development of multiorgan failure related to sepsis. Since the intestine is clinically not accessible for microcirculatory studies, the effects of a therapy with the antioxidants oxypurinol and U-74389G (lazaroid) as well as the vasoactive substances iloprost (a prostacyclin analogue) and dopexamine on the intestinal microcirculation and the systemic mediator release was studied in an animal model with moderate and high endotoxin challenge.

The intravital microscopic examination of the capillary perfusion in the muscularis layer of the intestine during endotoxemia revealed an improvement by administration of oxypurinol and dopexamine. The perfusion of the mucosa could be increased by iloprost administration. The amount of the endotoxin induced, intestinal leukocyte adherence was especially decreased by the treatment with the antioxidants.

Both therapeutic options caused a 60 % reduction in the initial tumor necrosis factor- α -release in the experiments with the lower endotoxin dose. Malondialdehyde analyses showed that oxypurinol and U-74389G reduced effectively the intestinal, radical-induced lipid peroxidation.

The intestinal microvascular blood flow could be significantly increased by both vasoactive substances - as well as with moderately than also with elevated endotoxin-dosage.

The results of the study confirmed that both reactive oxygen-species as well as an inadequate perfusion in the microcirculation represent essential pathogenetic factors during endotoxemia as well as sepsis and index corresponding therapy-forms and participates effective. A combined offering both substance-classes appears therefore meaningfully and should be evaluated in further experimental and clinical studies.

Keywords:

Endotoxin, sepsis, intestine, antioxidants, oxypurinol, lazarooids, dopexamine, iloprost, intravital microscopy, laser Doppler flowmetry, tumor necrosis factor alpha, malondialdehyde, animal experiment, rat

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	Einführung.....	8
1.2	Definitionen.....	9
1.3	Bedeutung des Intestinums.....	12
2	THEORETISCHE VORBETRACHTUNGEN.....	15
2.1	Ätiopathogenese der Sepsis.....	15
2.1.1	Ätiologie.....	15
2.1.1.1	Endotoxin	15
2.1.1.2	Endotoxin-Rezeptoren.....	17
2.1.2	Pathogenese.....	18
2.1.2.1	Tumornekrosefaktor- α	19
2.1.2.2	Reaktive Sauerstoffspezies.....	20
2.1.3	Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	24
2.2	Sepsismodelle.....	28
2.3	Therapeutische Optionen.....	31
2.3.1	Antioxidative Substanzen.....	32
2.3.1.1	Oxypurinol.....	32
2.3.1.2	Lazaroide	33
2.3.2	Vasoaktive Substanzen.....	34
2.3.2.1	Dopexamin	35
2.3.2.2	Iloprost	36
2.4	Monitoring.....	38
3	FRAGESTELLUNG	39
3.1	Fragestellung Teil 1.....	39
3.2	Fragestellung Teil 2.....	40
4	METHODIK.....	42

4.1	Versuchstiere	42
4.1.1	Tiermaterial	42
4.1.2	Gruppeneinteilung	42
4.1.2.1	Teil 1 – antioxidative Substanzen	42
4.1.2.2	Teil 2 – vasoaktive Substanzen	43
4.2	Versuchsmodell	44
4.2.1	Versuchsablauf	44
4.2.2	Anästhesie und Monitoring	44
4.2.3	Operative Technik	46
4.3	Labor	47
4.3.1	Leukozyten	47
4.3.2	Laktat	47
4.3.3	Blutgasanalyse	47
4.3.4	Tumornekrosefaktor- α	47
4.3.5	Malondialdehyd	48
4.4	Intravitalmikroskopie	49
4.4.1	Technik	49
4.4.2	Leukozytenadhärenz	51
4.4.3	Funktionelle Kapillardichte	54
4.5	Laser-Doppler-Flowmetrie	57
4.6	Powerspektralanalyse	57
4.7	Statistik	61
5	ERGEBNISSE	62
5.1	Teil 1 – antioxidative Substanzen	62
5.1.1	Klinische Parameter	62
5.1.1.1	Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck	62
5.1.1.2	Sauerstoffpartialdruck, Kohlendioxidpartialdruck, pH-Wert	66
5.1.1.3	Laktat	69
5.1.1.4	Leukozyten	71
5.1.2	Intravitalmikroskopie	73
5.1.2.1	Roller-Flow	73
5.1.2.2	Sticker	75
5.1.2.3	Funktionelle Kapillardichte	77

5.1.3	Tumornekrosefaktor- α	80
5.1.4	Malondialdehyd.....	82
5.2	Teil 2 – vasoaktive Substanzen	84
5.2.1	Klinische Parameter	84
5.2.1.1	Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck	84
5.2.1.2	Sauerstoffpartialdruck, Kohlendioxidpartialdruck, pH-Wert	88
5.2.1.3	Laktat.....	91
5.2.1.4	Leukozyten	93
5.2.2	Intravitalmikroskopie	95
5.2.2.1	Roller-Flow	95
5.2.2.2	Sticker.....	97
5.2.2.3	Funktionelle Kapillardichte	99
5.2.3	Tumornekrosefaktor- α	102
5.2.4	Intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss	104
5.2.5	Powerspektralanalyse	106
5.2.5.1	RR-Spektren	106
5.2.5.2	IMBF-Spektren.....	107
6	DISKUSSION	109
6.1	Hämodynamik	109
6.1.1	Hämodynamische Veränderungen bei experimenteller Endotoxinämie	109
6.1.2	Einfluss der untersuchten Substanzen	113
6.2	Laborparameter	115
6.2.1	Blutgasanalyse.....	115
6.2.2	Laktat	117
6.2.3	Leukozyten.....	119
6.3	Intravitalmikroskopie	120
6.3.1	Leukozytenadhärenz.....	120
6.3.1.1	Einfluss antioxidativer Substanzen.....	124
6.3.1.2	Einfluss vasoaktiver Substanzen	126
6.3.2	Funktionelle Kapillardichte.....	128
6.3.2.1	Einfluss antioxidativer Substanzen.....	129
6.3.2.2	Einfluss vasoaktiver Substanzen	130
6.4	Tumornekrosefaktor- α	132
6.4.1	Einfluss antioxidativer Substanzen	134

6.4.2	Einfluss vasoaktiver Substanzen	136
6.5	Malondialdehyd.....	137
6.6	Intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss	141
6.7	Powerspektralanalyse	147
6.8	Vergleichende Bewertung der Teilstudien	152
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	156
8	LITERATURVERZEICHNIS	159
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	185
10	DANKSAGUNG.....	187
11	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	189

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Sepsis mit konsekutivem Multiorganversagen stellt die häufigste Todesursache kritisch kranker Patienten auf einer interdisziplinären Intensivstation dar [34]. In der Todesursachenstatistik steht die Septikämie (ICD-9: 038; ICD-10: A41) in den USA heute an der dritten Stelle der infektionsbedingten Sterbefälle und an der zwölften Stelle in der Gesamtmortalität [34; 213]. Die Anzahl der Todesfälle nahm in den letzten zwei Jahrzehnten um 83 % zu [213]. In Deutschland hat sich die Zahl der Todesfälle an bakteriellen Infektionen seit 1980 sogar mehr als verdreifacht [278]. Allein 1997 starben 7701 Patient in Deutschland an einer Infektion (Berlin: 241). Die Sepsis liegt dabei mit 3348 Todesfällen an der Spitze (Berlin: 64; 2. Stelle nach HIV-Todesfällen, [279]). Die Ursachen für diese Entwicklung sind in der wachsenden Zahl multimorbider älterer Patienten und der Zunahme invasiver diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen zu sehen. Die Inzidenz der Sepsis wird z. Zt. mit 0,5 bis 2 % aller Krankenhauspatienten angegeben [153; 248]. Auf Intensivstationen wird wegen der latenten Infektionsgefährdung eine höhere Inzidenz beobachtet (9 - 16 %, [169; 331]). Die Letalität der Sepsis ist trotz der Fortschritte der Medizin in den letzten Jahren mit ca. 40 % unverändert hoch und steigt im septischen Schock bis auf über 70 % [48; 170].

Daher gilt der Ätiopathogenese und Therapie der Sepsis das Interesse jedes intensivmedizinisch tätigen Arztes. Durch den hohen personellen und materiellen Aufwand bei der Behandlung der Patienten und die knapper werdenden Ressourcen ist dies ein Thema von gesellschaftlicher Relevanz. Hinzu kommen die ethischen Probleme in diesem Grenzbereich zwischen Leben und Tod, welche nur gemeinschaftlich von allen Betroffenen gelöst werden können.

1.2 Definitionen

Die Sepsis ist ein schon seit Jahrtausenden bekanntes klinisches Krankheitsbild. Bereits *Hippokrates* beschrieb 400 v.Chr. eine Krankheit, die 7-14 Tage nach einer Verwundung mit Fieber beginnt und oft zum Tode führte. Seine Hypothese, dass dies durch Fäulnis (σηπῶ = faul machen) im Gewebe und dadurch freigesetzte Gifte geschehe, blieb zunächst als pathophysiologische Erklärung über lange Zeit bestehen [159]. Noch *Semmelweis* ging 1847 bei der von ihm eingeführten Händedesinfektion, welche zu einer dramatischen Reduktion der Kindbettsterblichkeit führte, von der Verhinderung der Übertragung eines putriden Giftes aus [181].

Erst durch die Entdeckung bakterieller Krankheitserreger durch Forscher wie *Koch* und *Pasteur* war der Weg frei für eine fundierte Erklärung der Sepsis. Die Theorie von der Fäulnis als Ursache der Sepsis wurde verlassen. 1885 wurde die Sepsis von *Ziegler* erstmals definiert als „eine Vergiftung des Organismus durch Toxine, Toxalbumine, Fermente und andere Produkte bakteriitischer Zersetzung“ [329]. Bekannt wurde die Formulierung von *Schottmüller* (1914): „Wir definieren also: eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch diese Invasion subjektiv und objektiv Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ [261]. Zu dieser Zeit standen jedoch weder Antibiotika noch sonstige potente Therapeutika zur Verfügung.

Dies änderte sich erst 1928 mit der Entdeckung des Penicillins durch *Fleming* [240]. Weitere Antibiotika folgten, das intensivmedizinische Monitoring verbesserte sich und adjuvante medikamentöse Therapien wurden entwickelt. Als Ende der achtziger Jahre das Methylprednisolon in die adjuvante Sepsistherapie eingeführt wurde, stellte sich heraus, dass die bisherige Sepsisdefinition nicht ausreichte, um miteinander vergleichbare Studien durchzuführen. Deshalb definierte *Bone* vier unterschiedliche Schweregrade dieses Krankheitsbildes (Sepsis, Sepsis-Syndrom, septischer Schock, therapierefraktärer septischer Schock) und erklärte die systemische Reaktion auf eine Infektion zur Basis des gesamten Syndroms [30].

Da aber auch nichtinfektionsbedingte Erkrankungen zu einem sepsisähnlichen klinischen Bild führen können, wurde 1991 im Rahmen einer Consensus Conference der amerikanischen Society of Critical Care Medicine und des American College of Chest Physicians die derzeit gültige Definition der Krankheitsentität festgelegt [33]. Demnach gilt:

Eine systemische Inflamationsreaktion (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) besteht bei dem Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Symptome:

- a) Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$,
- b) Herzfrequenz $> 90/\text{min}$,
- c) Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$,
- d) Leukozyten $> 12.000/\text{mm}^3$ oder $< 4.000/\text{mm}^3$ oder $> 10 \%$ unreife Neutrophile.

Wenn die systemische inflammatorische Reaktion durch eine gesicherte infektiöse Ursache bedingt ist, wird sie Sepsis genannt. Zusätzlich wurden folgende Definitionen gegeben:

- a) Infektion: Entzündliche Gewebereaktion auf Mikroorganismen oder Invasion von Mikroorganismen in normalerweise steriles Gewebe.
- b) Bakteriämie: Vorhandensein vitaler Bakterien im Blut; die Anwesenheit von Viren, Pilzen, Parasiten oder anderen Pathogenen in der Blutbahn sollte entsprechend benannt werden.
- c) Schwere Sepsis: Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotonie. Hypoperfusionszeichen werden u.a. definiert als Laktaterhöhung, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage. Die sepsisinduzierte Hypotonie wird definiert als systolischer Blutdruck $< 90 \text{ mmHg}$ oder als Reduktion um mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert bei Fehlen anderer Hypotonieursachen.
- d) Septischer Schock: Sepsisinduzierter Schock mit Hypotonie trotz adäquater Volumensubstitution, einhergehend mit Zeichen der Hypoperfusion oder Organdysfunktion (s.o.). Patienten, die infolge einer Therapie mit inotropen oder vasokonstriktiven Substanzen nicht mehr hypotensiv sind, aber dennoch Zeichen der Hypoperfusion oder Organdysfunktion aufweisen, werden trotzdem dem Stadium des septischen Schocks zugeordnet.

Dank differenzierter diagnostischer Methoden können heute verschiedene Aktivierungszustände des Immunsystems während der Sepsis unterschieden werden. Im Krankheitsverlauf kann außer der systemischen Inflamationsreaktion (SIRS) auch ein kompensatorisches antiinflammatorisches Reaktionssyndrom (compensatory

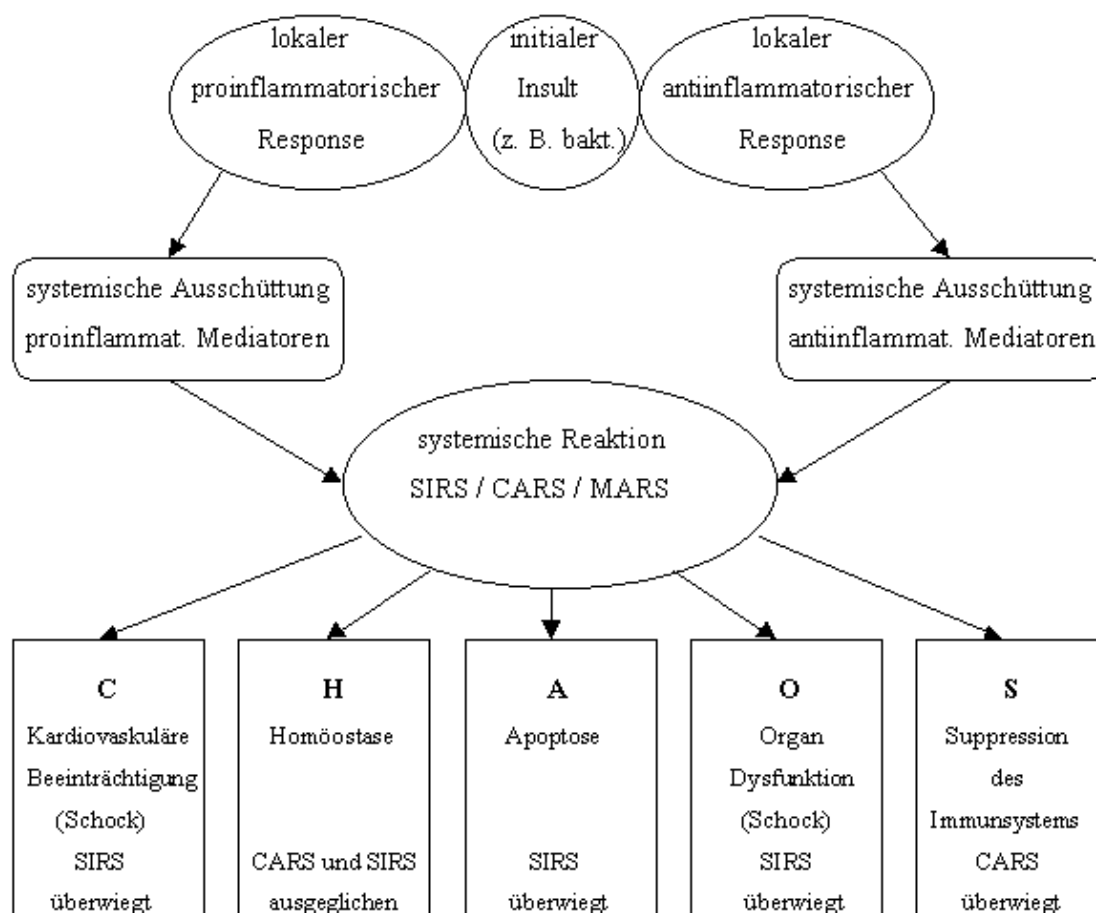


Abb. 1: Sepsisstadien nach Bone [32]

antiinflammatory response syndrome, CARS) entstehen oder es wechseln sich Phasen pro- und antiinflammatorischer Reaktionen im Sinne eines gemischten antagonistischen Reaktionssyndroms (mixed antagonistic response syndrome, MARS) ab [32].

Als Multiorganversagen (MOV) bezeichnet man das gleichzeitig oder in rascher zeitlicher Abfolge auftretende Versagen von zwei oder mehr vitalen Organsystemen [16]. Man unterscheidet das frühe, primäre von einem späten, sekundären Multiorganversagen. Ein primäres MOV kann unmittelbar im Rahmen eines schweren Traumas, von Operationen mit ausgedehnter Gewebeerstörung oder nach ausgeprägten Schockzuständen entstehen. Das sekundäre MOV entwickelt sich erst nach einer initial stabilen Phase durch einen zweiten Insult, wie z.B. eine bakterielle Infektion („Two-hit“-Modell [63]).

Dem Multiorganversagen gehen in der Regel Zeichen einer Organinsuffizienz voraus. Die insuffiziente Leistung mehrerer Organe bezeichnet man als Multiorgandysfunktions-syndrom (MODS [33]).

1.3 Bedeutung des Intestinums

Das Intestinum stellt für den Organismus ein peripheres Stromgebiet dar. Im Gegensatz zu den Vitalorganen, wie Herz und Gehirn, erfährt es in kritischen Situationen keine bevorzugte Perfusion. Diese primär sinnvolle Regulation kann jedoch bei längerem Andauern zu einer Gefahr für den Gesamtorganismus werden. So betrachtet man den Darm in der Sepsis heute nicht mehr als „stillen Teilhaber“, sondern bezeichnet ihn als „Motor des Multiorganversagens“ [52; 192].

Die intestinale Zirkulation wird wegen des venösen Abflusses in die Leber oftmals als Einheit mit der hepatischen Zirkulation gesehen [177]. Das Hepatosplanchnikusgebiet erhält insgesamt ca. 25 % des Herzminutenvolumens. Dieses Verhältnis bleibt auch in der Sepsis annähernd erhalten. Der Blutfluss zu Darm und Leber steigt proportional mit dem Herzminutenvolumen an [59; 60]. Allerdings steigt der Sauerstoffbedarf im Hepatosplanchnikusgebiet ungleich stärker an, so dass schon in der frühen, hyperdynamen Phase der Sepsis funktionelle Hypoperfusion und Organdysfunktion resultieren können [60; 226].

Im septischen Schock ist das Intestinum aufgrund seiner Anatomie besonders gefährdet. Im Bereich der Mukosa, die eine Barrierschicht gegenüber pathogenen Bakterien und deren Toxinen darstellt, besteht ein Gegenstromdiffusionsprinzip. Die zentrale Villusarteriole verzweigt sich erst an der Zottenspitze. Zu ihr parallel verläuft das abführende kapillär-venöse System. So kommt es bereits an der Zottenbasis aufgrund des hohen Gradienten zu einem starken pO_2 -Abfall im arteriolären Blut. Bei kritischem Blutdruckabfall kann es schnell zu einer Minderversorgung der Zottenspitze, einem Ödem der Lamina propria und letztendlich zu Epithelnekrosen kommen. Damit ist die mukosale Integrität aufgehoben und eine vermehrte Translokation von Bakterien und deren Toxinen möglich. Der Darm wird zum „undrained abscess“ und kann das septische Krankheitsbild aggravieren [192].

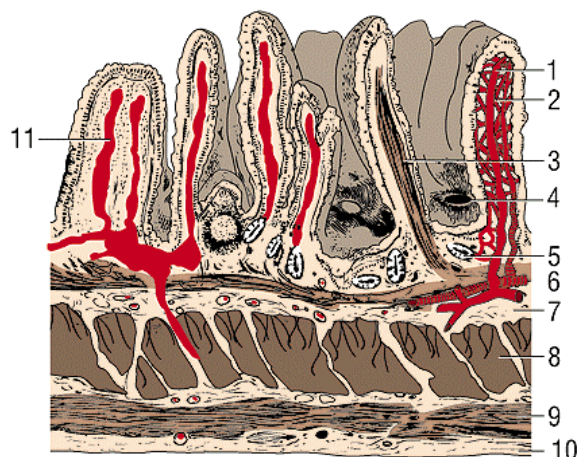


Abb. 2: Mikroanatomie des Intestinums; 1 – Arteriole, 2 – Kapillaren, 3 – glatte Muskelzelle, 4 – Krypteneingang, 5 – *Lieberkühn*-Krypte, 6 – Muscularis mucosae, 7 – Submucosa, 8 – Muscularis circ., 9 – Muscularis long., 10 – Serosa (aus [21])

In verschiedenen Untersuchungsansätzen konnte das Phänomen der bakteriellen Translokation belegt werden. Experimentell wurde dies u.a. in Ischämie/Reperfusions-Modellen, bei Endotoxinämie, im hämorrhagischen Schock und bei Trauma nachgewiesen [12; 13; 65; 318]. Klinisch scheint dieser Pathomechanismus ebenso eine wichtige Rolle zu spielen. Beim primär nichtinfektiösen Multiorgan dysfunktionssyndrom könnte die bakterielle Translokation sogar ursächlich beteiligt sein [65]. Auch bei der Kachexie in der chronischen Herzinsuffizienz werden Translokationsprozesse postuliert [7].

Interessanterweise korrelieren funktionelle Parameter des Hepatosplanchnikusstromgebietes eng mit der Outcome septischer Patienten. So fanden *Kholoussy* et al. eine signifikante Korrelation der hepatischen Indocyaningrün-Clearance mit dem Überleben dieser Patienten [152]. Andere Untersucher stellten fest, dass der gastrale bzw. sigmoidale pH_i -Wert die Mortalität im septischen Multiorganversagen vorhersagen kann [126; 154; 274]. In den wichtigsten Scoring-Systemen, wie APACHE, SAPS und SOFA, sind ebenfalls Parameter des Hepatosplanchnikusgebietes integriert [156; 170; 306].

Die Rolle des Intestinums ist jedoch vor allem im Konzept der Homöostase des Gesamtorganismus zu sehen. Dieser integrative Ansatz verspricht die größten Erfolgsaussichten für die Entwicklung effektiver Therapiestrategien in der Sepsis. Über die Protektion des Intestinums hinaus ist immer auch die Stabilisierung des Gesamtzustandes Ziel der Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden dabei verschiedene Therapiekonzepte verfolgt. Zum einen wurde eine Behandlung mit antioxidativen Substanzen (21-Aminosteroid U-74389G; Oxypurinol) und zum anderen die Gabe von vasoaktiven Medikamenten (Iloprost; Dopexamin) in Bezug auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung bei experimenteller Endotoxinämie evaluiert. Die Untersuchung der intestinalen Mikrozirkulation erfolgte mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und der Laser-Doppler-Flowmetrie. Als primärer Mediator im septischen Geschehen wurde der Tumornekrosefaktor- α im Serum analysiert. Als Marker für die Wirkung freier Sauerstoffradikale, die einen weiteren wesentlichen Mediator darstellen, wurde das Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd bestimmt. Zusätzlich wurden Powerspektralanalysen des systemischen Blutdrucks und des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses durchgeführt, um Informationen über das autonome Nervensystem bei Endotoxinämie und dessen pharmakologische Beeinflussbarkeit zu erhalten.

2 Theoretische Vorbetrachtungen

2.1 Ätiopathogenese der Sepsis

2.1.1 Ätiologie

Ausgehend von der Definition der Sepsis nach den Kriterien der ACCP/SCCM-Consensus Conference 1991 handelt es sich um die systemische Reaktion auf eine Infektion, verbunden mit klinischen Symptomen [33]. Verknüpft man aus didaktischen Gründen wegen der in weiten Strecken identischen Abläufe in der Pathogenese die Ätiologie von Sepsis und SIRS, so kommen die verschiedensten Ursachen als Stimuli des Krankheitsprozesses in Betracht. Neben Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten sind es Ereignisse wie Trauma, Reperfusion, hypovolämischer / hämorrhagischer Schock, Pankreatitis oder auch die extrakorporale Zirkulation [31; 48; 225].

Die pathophysiologischen Vorgänge seien exemplarisch anhand einer Sepsis durch gramnegative Erreger dargestellt, da sie auch als tierexperimentelles Modell in dieser Arbeit diene. Gramnegative Bakterien sind für mehr als ein Drittel der Sepsis-Episoden verantwortlich [248]. Am häufigsten wird *Escherichia coli* isoliert [245]. Das pathogene Agens der gramnegativen Bakterien ist das Endotoxin.

2.1.1.1 Endotoxin

Endotoxine sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Chemisch sind sie Lipopolysaccharide. Die Begriffe Endotoxin und Lipopolysaccharid (LPS) werden oft synonym benutzt. Als LPS wird im engeren Sinne die durch Phenol-, Trichloroacetat- oder Chloroform-Phenol-Petroleum-Etherextraktion aus Bakterien gewonnene Reinsubstanz bezeichnet. Endotoxin ist das natürlich vorkommende Agens.

Das LPS-Polymer ist aus einem variablen Polysaccharidanteil, bestehend aus O-Antigen und dem zweiteiligen Kernoligosaccharid (inner core, outer core), und einem bei allen gramnegativen Bakterien einheitlichen Lipidkomplex, dem Lipid A, aufgebaut. Das O-

Antigen ist über die Core-Struktur kovalent mit dem Lipid-A verbunden, welches fest in der äußeren Schicht der Bakterienmembran verankert ist [151]. Das O-Antigen wird hingegen von den gramnegativen Bakterien auf der Membranoberfläche präsentiert. Die molekulare Struktur des O-Antigen variiert innerhalb der Bakterienspezies stark, so dass anhand des O-Antigens eine Typisierung verschiedener Stämme möglich ist („fingerprint“). Gegen diesen Bestandteil des Endotoxins werden bei einer Infektion des menschlichen Organismus Serotyp-spezifische Antikörper (AK) gebildet, die zu einer Opsonierung und Phagozytose des Bakteriums führen (Serotyp-spezifische Immunantwort). Das O-Antigen ist jedoch, wenn es ohne das "Rest-Endotoxin" appliziert wird, wenig toxisch [151; 237].

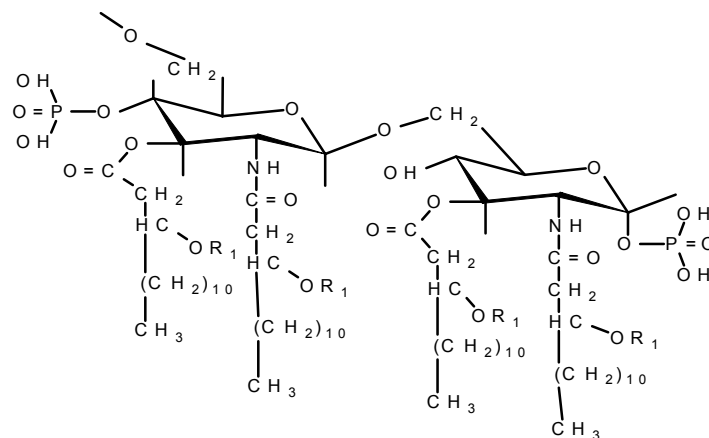


Abb. 3: Lipid-A; Chemische Struktur

Die wesentliche Toxizität des LPS ist dem Lipid A zuzuordnen. Diese, in allen gramnegativen Bakterien hochkonservierte Struktur, ist für einen Großteil der pathophysiologischen Veränderungen verantwortlich und ebenso essentiell für die LPS-Bindung durch immunkompetente Zellen. Auch dann, wenn es ohne die anderen Komponenten (Kernoligosaccharid und O-Antigen) des LPS appliziert wird, ruft es ein breites Spektrum von Reaktionen hervor, die auch unter septischen Bedingungen beim Menschen beobachtet werden können [47; 237].

Endotoxin wird von Bakterien entweder während ihres schnellen Wachstums oder ihrer Zerstörung freigesetzt [3]. In der Regel liegt es in Form von Aggregaten oder Mizellen vor. Einmal freigesetzt, bindet Endotoxin schnell an verschiedene Serumproteine und Rezeptoren.

2.1.1.2 Endotoxin-Rezeptoren

Die Bindung von Endotoxin an Serumproteine kann zu einer Abschwächung der Toxizität im Sinne einer Neutralisierung führen. Dies ist z.B. bei der Bindung an das high density lipoprotein (HDL), das low density lipoprotein (LDL) oder das bactericidal permeability-increasing protein (BPI) der Fall [191; 237]. BPI ist in den azurophilen Granula der Neutrophilen gespeichert [81; 237].

Andererseits dienen bestimmte Proteine zur Vermittlung und Verstärkung der Endotoxinwirkung im Sinne einer Opsonierung. Hier ist vor allem das lipopolysaccharide binding protein (LBP) zu nennen. Der LBP/LPS-Komplex bewirkt eine 1000fach stärkere TNF- α -Induktion in Makrophagen als LPS allein [194]. Eine ähnliche Rolle scheint das Septin zu spielen [319].

BPI und LBP weisen eine starke Ähnlichkeit auf [263]. Beide 60 kD-Proteine stimmen in der Aminosäuresequenz am NH₂-terminalen Ende zu 45 % überein. An dieser Stelle binden sie hochaffin Lipid A. Ihre Erbinformation ist in derselben Region des Chromosoms 20 kodiert [107]. In der Sepsis finden sich erhöhte Serumkonzentrationen beider Proteine.

Der zellständige Akzeptor für den LBP/LPS-Komplex ist die CD14-Struktur, ein membranassoziiertes Glykoprotein (53 kD). Es wird besonders auf aktivierten Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gefunden [47; 66]. Der CD14-Rezeptor haftet über einen Glycophosphatidylinositol-Anker (GPI) an der Zellmembran und besitzt keine transmembranäre Domäne. Dies scheint eine Funktion als direkt wirkendes Zellsignalprotein auszuschließen [269]. CD14 wird jedoch nach Bindung des Liganden internalisiert und ist eng assoziiert mit einem Protein, das Kinaseaktivität besitzt. Die Kinaseaktivität ist von entscheidender Funktion bei der intrazellulären Signaltransduktion [320]. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Toll-like-Rezeptoren [267]. Eine weitere Konsequenz der GPI-Verankerung des Moleküls in der Zellmembran ist die leichte Abspaltbarkeit des Moleküls durch GPI-spezifische Phospholipasen C und D.

Das „shedding“ von CD14 führt zu löslichen Formen des LPS-Rezeptors (soluble CD14, sCD14; [20]). Lösliches CD14 kann einerseits die Endotoxinaktivität im Serum inhibieren, andererseits können LBP/LPS/sCD14-Komplexe Zellen aktivieren, die CD14 nicht auf der Membranoberfläche exprimieren [84]. Da ein CD14-Verlust jedoch nicht zu einem totalen Reaktionsverlust gegenüber LPS führt, werden zusätzliche CD14-unabhängige Endotoxinsignalübermittlungswege angenommen [47].

Weitere leukozytäre LPS-Rezeptoren sind die Rezeptoren der Familie der CD11b/CD18-Glykoproteine [47]. Auch der sogenannte Scavenger-Rezeptor auf Makrophagen, ein 95 kD Molekül, bindet LPS und spielt eine Rolle bei der Entgiftung und Erkennung des Endotoxins. Die LPS-Bindung an diesen Rezeptor führt jedoch nicht zu einer Aktivierung der Makrophagen und Monozyten [118].

2.1.2 Pathogenese

Infolge des primären Insults (hier: Endotoxin) kommt es zur Aktivierung humoraler (z.B. Komplement-, Gerinnungs-, Kallikrein-Kinin-System) und zellulärer (Monozyten/Makrophagen, Granulozyten u.a.) Kaskadensysteme mit Freisetzung von entsprechenden Mediatoren. Zu den wichtigsten Mediatorgruppen gehören Zytokine, Eicosanoide und reaktiven Sauerstoffspezies. Zytokine sind sezernierte Signalproteine, die mit spezifischen zellulären Rezeptoren reagieren. Ihre biologische Aktivität liegt im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-13} M und ist damit der von Hormonen vergleichbar. Sie wirken sowohl autokrin (auf die eigene Zelle zurück) als auch parakrin (auf andere Zellen). In der Sepsis pathogenetisch wichtige Zytokine sind die Interleukine (IL), die Interferone (IFN), der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und verschiedene koloniestimulierende Faktoren (z.B. G-CSF, GM-CSF). Da parallel zur Entzündungsreaktion sofort eine Gegenregulation einsetzt, kann eine weitere Unterteilung der Zytokine nach pro- oder antiinflammatorischer Potenz vorgenommen werden. Als proinflammatorisch gelten u.a. TNF- α , IL-1 und IL-8, antiinflammatorisch wirken z.B. TGF- β , IL-4 und IL-10. Dem TNF- α wird eine primäre Rolle in der Pathogenese der Sepsis zugeschrieben [31; 47].

2.1.2.1 Tumornekrosefaktor- α

Die herausragende Rolle des Mediators TNF- α resultiert aus verschiedenen Beobachtungen. Bei Sepsis erreicht TNF- α als erstes Zytokin Spitzenspiegel im Plasma [233]. Durch Gabe hoher Dosen von TNF- α können viele der Befunde und Symptome des septischen Schocks, wie Hypotension und Neutropenie, experimentell erzeugt werden [130; 296]. Die Gabe von Antikörpern gegen TNF- α schützt vor letalen Effekten einer experimentellen Infektion [136].

TNF- α (Syn.: Cachektin) ist ein 17 kD Molekül, das in großem Umfang von Monozyten / Makrophagen produziert wird. Es ist in Form größerer Vorläufermoleküle in der Zellmembran verankert. Seine Freisetzung erfolgt proteolytisch durch eine Serinprotease. Circa 30 min nach einem experimentellen Endotoxinbolus ist TNF- α im Serum messbar. Das Maximum wird ungefähr 90 min danach erreicht [265]. TNF- α entfaltet seine Wirkung auf fast allen Zellen über Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche der Zielzellen befinden.

Zwei TNF- α -Rezeptortypen, ein 55 kD (Typ I, CD120a) und ein 75 kD (Typ II, CD120b) Rezeptor sind beschrieben. Die Mehrzahl der schädigenden Mechanismen wie Zytokinsynthese und Zytotoxizität, werden durch den kleineren 55 kD Rezeptor vermittelt. Die biologische Wirkung von TNF- α wird durch TNF- α -bindende Proteine inhibiert. Sie stellen Fragmente extrazellulärer Domänen der TNF-Membranrezeptoren dar (sogenannte lösliche TNF-Rezeptoren p55, p75).

TNF- α induziert unter anderem die Aktivierung von nukleärem Faktor κ B (NF- κ B). In Endothelzellen und Leukozyten kommt es dadurch z.B. zur Expression weiterer Zytokine, insbesondere auch von sogenannten Adhäsionsmolekülen. Dies führt zur verstärkten Leukozytenadhärenz am Endothel (s.u.).

Über die Anlagerung der Adaptermoleküle TRADD (TNF-R1-associated death domain protein) und FADD (Fas-associated death domain protein) an den TNF-Typ I-Rezeptor wird die Caspase-8 aktiviert und somit Apoptose ausgelöst [229].

In den Monozyten und Makrophagen selbst – den Hauptproduzenten von TNF- α - kommt es zur Steigerung der Phagozytose, zur Auslösung des respiratory burst und damit zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [324]. Analog werden auch neutrophile Granulozyten aktiviert [102].

2.1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stellen einen weiteren wesentlichen Mediator in der Sepsis dar. Wegen der vorgeschalteten Aktivierungsprozesse werden sie auch als sekundäre, finale oder terminale Mediatoren bezeichnet. Zu den ROS zählen die freien Sauerstoffradikale sowie auch andere oxidierende Substanzen (z.B. NO).

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren unpaaren Elektronen. Im menschlichen Organismus fallen sie bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff sowie bei der Oxidation von Wasserstoffperoxid an. Die Reduktion des molekularen Sauerstoff zum Superoxidanion wird bei vielen biologischen Leistungen aerober Zellen, wie der Atmung, beobachtet. Reaktive Sauerstoffmetabolite werden desweiteren als Co-Substrat vieler biologischer Syntheseschritte nachgewiesen, z.B. bei Reaktionsschritten, die durch Oxigenasen katalysiert werden oder an der mischfunktionellen Oxidase der Mikrosomen [86].

Als Hauptquelle reaktiver Sauerstoffradikale in der Sepsis werden die Leukozyten angesehen. Im Rahmen der Leukozytenaktivierung kommt es zur Stimulation der NADPH-Oxidase. Sie katalysiert die Reduktion von Sauerstoff zum Superoxidanion.

Das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) wird normalerweise an Phagozytenvakuolen abgegeben, um dort an der Zerstörung eingeschlossener Bakterien mitzuwirken. Es kann aber auch - z.B. bei frustranter Phagozytose - an den Extrazellulärraum abgegeben werden. Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt den größten Teil der Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um. H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ haben selbst nur geringe antibakterielle Wirkungen. Sie sind aber Vorläufer wirksamerer Verbindungen, die in Folgereaktionen gebildet werden. In der Haber-Weiss-Reaktion reagieren H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ zum sehr reaktiven Hydroxylradikal. Unter biologischen Bedingungen muss diese Reaktion durch freies Eisen katalysiert werden, das abwechselnd als Oxidations- und Reduktionsmittel agiert. Bei der Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ kann Singulett-Sauerstoff entstehen [113].

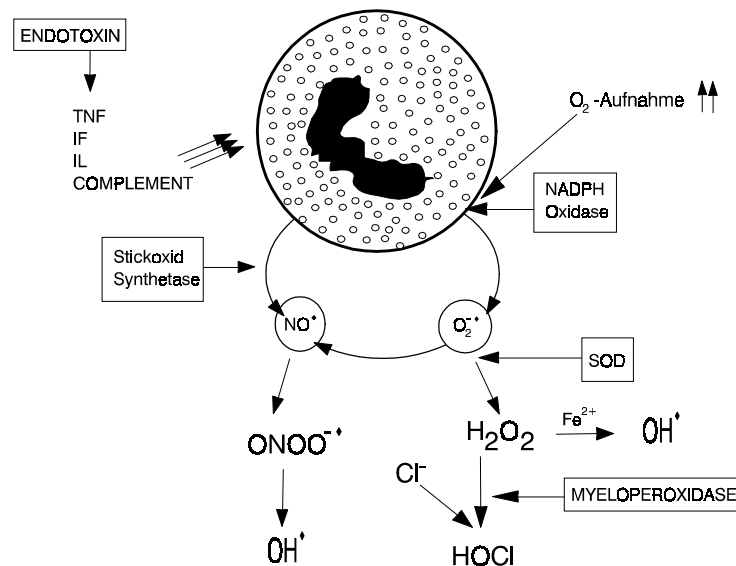


Abb. 4: O₂ - Sauerstoff, O₂•⁻ - Superoxidation, H₂O₂ - Wasserstoffperoxid, SOD - Superoxiddismutase, OH• - Hydroxylradikal, HOCl - unterchlorige Säure, ONOO⁻ - Peroxynitrite, NO• - Stickstoffmonoxid, Cl⁻ - Chloridion, TNF – Tumornekrosefaktor- α , IL - Interleukine, IF - γ -Interferon (aus [102])

Unterchlorige Säure (HOCl) ist ein Radikal mit einer wesentlich wirksameren antibakteriellen Wirkung. Es wird aus Chloridionen und H₂O₂ durch die Myeloperoxidase hergestellt [102; 155]. Dieses Enzym befindet sich in den azurophilen Granula von Phagozyten. Ein weiterer Reaktionsweg, der sich vom Superoxidation abzweigt, ist dessen Reaktion mit Stickoxiden, die von Endothel und Leukozyten gebildet werden, zu Peroxynitriten (ONOO⁻). Peroxynitrite wiederum zerfallen u.a. zum Hydroxylradikal (OH•).

Eine bedeutende ROS-Quelle ist auch das Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenasesystem. Dieses Enzymsystem ist insbesondere im Gefäßendothel lokalisiert und katalysiert die Zweischnittoxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und schließlich zu Harnsäure. Das Enzym existiert in 2 Zuständen. Die Dehydrogenaseform (XDH) nutzt NAD⁺ als Elektronenakzeptor. Die Oxidaseform (XO) benötigt molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Diese Form ist deshalb in der Lage, Superoxidradikale zu produzieren. Beide Enzymformen liegen unter normalen Bedingungen in einem Verhältnis von 85% zu 15% (XDH/XO) vor. Eine Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten der Oxidaseform wird bei Ischämie/Reperfusion (I/R) - Vorgängen beobachtet. Im Verlauf einer Sepsis können wiederholt Episoden von Ischämie und Reperfusion auftreten [332; 333].

Ebenso wird die Bildung der Xanthinoxidase aus der Xanthindehydrogenase im Rahmen der Leukozytenaktivierung induziert. Leukozyten besitzen offensichtlich eine entscheidende Funktion bei der XDH/XO-Umwandlung. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Elastase von aktivierten Neutrophilen, die in der Lage ist, eine XDH/XO Umwandlung vorzunehmen [231; 332].

Wenn ein Radikal sein unpaares Elektron abgibt, ein anderes Elektron aufnimmt oder mit einem Nichtradikal (einem Biomolekül) reagiert, wird aus dem Nichtradikal ein Radikal. Deshalb verläuft die Reaktion eines Radikals mit einem Nichtradikal oft als Kettenreaktion und geht mit der Bildung von in ihrer Struktur und/oder Funktion veränderten Reaktionsprodukten einher. Nur wenn zwei Radikale miteinander reagieren, entstehen nicht-radikalische Produkte (Terminationsreaktion, [158]). Freie Radikale können jede biochemische Komponente der Zelle attackieren. Jedoch sind Lipide, Proteine und Nukleinsäuren die wichtigsten "Ziele des radikalischen Stresses" [252].

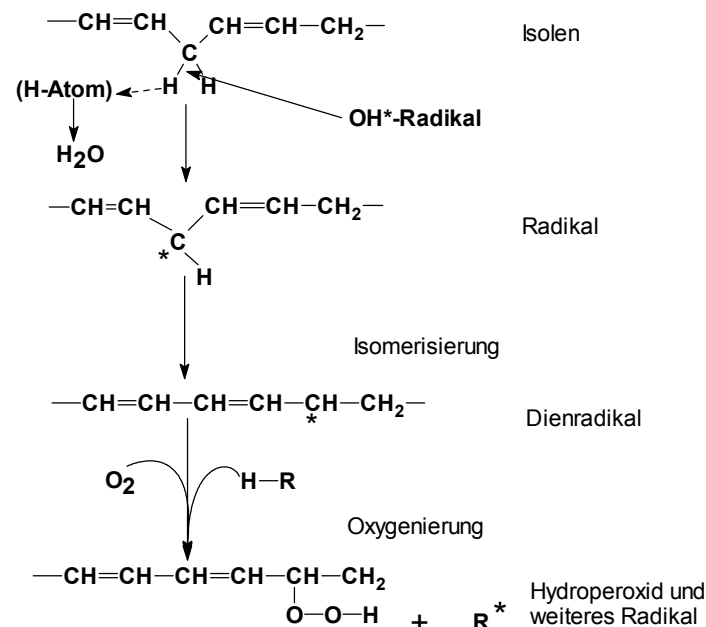


Abb. 5: Lipidperoxidation

Lipide sind sehr häufig betroffen, da sie ubiquitär im Organismus in der Biomembran von Zellen und Zellorganellen (Phospholipide) vorkommen. Hochreaktive Radikale, wie beispielsweise das Hydroxylradikal, können den Lipiden ein Wasserstoffatom entziehen [158]. Ziel sind insbesondere doppelt allylständige Wasserstoffatome. Es entstehen Lipidradikale. Diese reagieren mit Sauerstoff weiter zu einem Hydroperoxyradikal, welches sich z.B. durch Anlagerung eines Wasserstoffatoms aus einem noch nicht angegriffenen Lipidmolekül zum Hydroperoxylipid stabilisiert. Hierbei entsteht ein neues Lipidradikal. Fettsäureperoxide sind instabil und zerfallen unter Schädigung der Strukturen, deren Bestandteil sie sind.

Die Folgen können z.B. eine veränderte Membranfluidität und -permeabilität, einhergehend mit einer gestörten Zellverformbarkeit oder sogar die Zerstörung der Zellintegrität sein [158; 332]. Desweiteren entstehen stabile Reaktionsprodukte der Lipidperoxidation (reaktive Aldehyde, z.B. Malondialdehyd, 4-Hydroxyalkenal) - sogenannte diffusive Moleküle der Lipidperoxidation, die auch fern vom Ort ihrer Entstehung Toxizität vermitteln können [158].

Proteine werden sowohl durch das Hydroxylradikal als auch durch Superoxid oxidativ geschädigt. Schwefel enthaltende Aminosäuren sind hier besonders prädisponiert [112]. Hierbei kann durch die Oxidation von Thiolgruppen eine Veränderung der Enzymfunktion resultieren [158].

Destruktive Wirkungen von Radikalen wurden auch an Nukleinsäuren beschrieben. Sie beruhen darauf, dass Nukleinsäuren an ihrem Basenteil hydroxyliert werden und sich mit anderen Desoxyribonukleinsäuren (DNS) verbinden oder sich aufspalten. Chromosomenbrüche und Nukleinsäurestrukturmodifikationen sind möglich. Außerdem werden Replikations- und Reparationsmechanismen gestört [332].

ROS sind außerdem potente Induktoren z.B. des nukleären Faktors κB (NF- κB). Dies führt wiederum zu einer Perpetuierung der Mediatorfreisetzung und weiteren Leukozytenaktivierung im Sinne eines *circulus vitiosus* [182]. Unter physiologischen Bedingungen inhibieren endogene Antioxidantien die ROS-Wirkung. Im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion reicht die endogene antioxidative Kapazität jedoch nicht aus, so dass es zu den beschriebenen deletären Konsequenzen kommt.

2.1.3 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die durch die primären und sekundären Mediatoren aktivierten Leukozyten im Blutstrom interagieren in typischer Weise mit dem Gefäßendothel, das ebenfalls durch Mediatoren stimuliert wird. Dieser, bei lokaler Infektion sinnvolle Prozess zur Herdbekämpfung kann im Rahmen der überschießenden Leukozytenaktivierung bei Sepsis eine verheerende Wirkung ausüben. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) in der Mikrozirkulation multipler Organe führt über Perfusionsstörungen zu schweren Struktur- und Funktionsstörungen, die sich klinisch als MODS bzw. MOV darstellen. Sie stellen einen zentralen Pathomechanismus der Sepsis dar.

Unter Leukozyten-Endothel-Interaktion wird eine Sequenz von Vorgängen subsummiert, welche die Leukozytenmargination aus der Strommitte, das temporäre und feste Adhärenzen der Leukozyten am Gefäßendothel sowie deren Emigration ins Gewebe beschreibt und sich über die Expression von Adhäsionsmolekülen vollzieht. Neben einer verstärkten Aktivierung der LEI sind bei Endotoxinämie und Sepsis auch Störungen, z.B. der Migrationsfähigkeit der aktivierten Leukozyten beschrieben [318].

Das temporäre Interagieren der Leukozyten mit dem Endothel (Leukozyten-Rolling) wird vornehmlich durch eine Familie von drei monomeren Adhäsionsrezeptoren, welche alle eine sich gleichende NH₂-terminale extrazelluläre Domäne besitzen - die sogenannten Selectine (P-, L-, E-Selectin) - vermittelt.

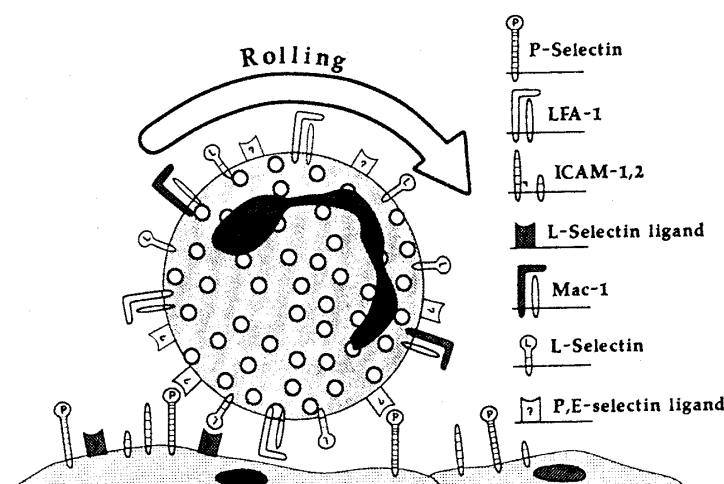


Abb. 6: Leukozytenrolling, Erläuterung siehe Text (aus [184])

L-Selectin (Syn.: LECAM-1, LAM-1, Mel-14 antigen, gp90^{mel}, Leu8/TQ-1 antigen, CD62L) ist das kleinste der Selectine. Es ist auch ohne äußere Stimuli reichlich auf Granulozyten, Monozyten und zirkulierenden Lymphozyten vorhanden und besitzt sowohl Liganden- als auch Rezeptorfunktion [184]. Es erkennt komplexe Zuckerstrukturen als Seitenketten induzierbarer Trägermoleküle (Membranproteine und -lipide), wie z.B. das Sialyl-Lewis^x-Antigen (SLe^x) und übernimmt so das primäre Andocken der Granulozyten an die Endothelbarriere. Diese initiale Bindung geht unmittelbar in eine rollende Bewegung über, bei der sich die Zellen im Blutstrom um ihre eigene Achse drehen. Das Rollen kommt durch eine Vielzahl von transienten, aber repetitiven Bindungen zustande (Überwiegen der Scherkräfte). L-Selectin präsentiert selbst SLe^x-enthaltende Epitope und ist somit auch Ligand für P- und E-Selectin [184].

P-Selectin (Syn.: GMP-140, PADGEM, CD62P) wurde ursprünglich auf aktivierten Thrombozyten gefunden, später aber auch in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen identifiziert [36]. Es ist das größte der bekannten Selectine und ragt ungefähr 40 nm über die Endothelzelloberfläche hinaus [276]. Es wird nach kurzer Stimulation z.B. mit LPS, TNF- α oder H₂O₂ blitzartig auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert [184; 227]. Die Expression ist jedoch nicht dauerhaft und scheint somit nur in der Frühphase der Leukozytenadhäsion von Bedeutung zu sein.

E-Selectin (Syn.: ELAM-1, CD62E) wird ausschließlich auf Zytokin- und/oder LPS-aktivierten Endothelzellen gefunden. In kultivierten Endothelzellen findet man eine maximale Expression nach vier Stunden, welche ca. 24 Stunden anhält [24]. An E-Selectin binden hauptsächlich Granulozyten, aber auch Monozyten und einige T-Zell-Subpopulationen. E-Selectin wird eine wichtige Funktion bei der Granulozytenmigration durch zytokinaktivierte Endothelzellen hindurch zugeschrieben. Weitere alternative Wege werden vermutet, da der Migrationsprozess die E-Selectin-Expressionszeitspanne überdauert [184].

Alle drei Selectine erkennen unterschiedliche Glykoproteine und/oder Glykolipide, die jedoch alle Sialyl-Lewis^x oder das Isomer Sialyl-Lewis^a enthalten. Diese Liganden werden auf allen zirkulierenden myelogenen Zellen sowie auch auf zirkulierenden Lymphozyten exprimiert. Insbesondere Sialyl-Lewis^x, welches Bestandteil von L-Selectin auf Granulozyten ist, agiert als Ligand für Endothelzellen, an deren Oberfläche E-Selectin und P-Selectin exprimiert werden [184]. Zusätzlich wurde das Glykolipid Sulfatid als ein potentieller Ligand für P- und L-Selectin erkannt.

Die feste Leukozytenadhärenz wird unter physiologischen Wandscherraten durch Integrine vermittelt. Integrine sind Heterodimere, die aus größeren α -Untereinheiten (120-170

kD) und kleineren β -Untereinheiten (90-100 kD) bestehen. Beides sind Transmembranproteine, die ihren Hauptteil extrazellulär exponieren. Die β_2 -Subfamilie der Integrine, die ausschließlich auf Leukozyten exprimiert wird, beinhaltet verschiedene Heterodimere, welche alle die β_2 -Kette (CD18) enthalten. β_2 -Integrine werden ständig auf zirkulierenden Leukozyten exprimiert, ohne dass sie in ihrem Nativzustand Adhäsivität vermitteln.

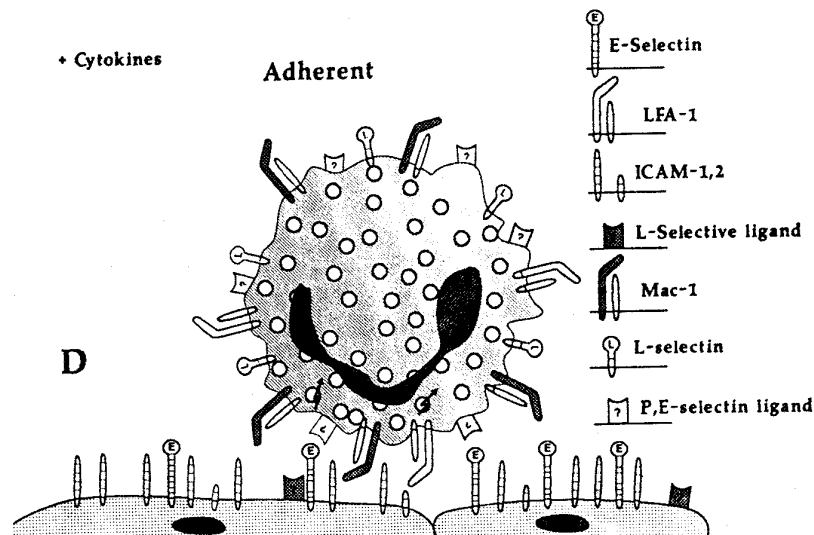


Abb. 7: Leukozytensticking, Erläuterung siehe Text (aus [184])

Man unterscheidet LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1, CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$ -Integrin) auf Lymphozyten und Mac-1 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$ -Integrin) auf Granulozyten/Monozyten, welche zusätzlich P150,95 (Syn.: CD11c/CD18, $\alpha_X\beta_2$) exprimieren. Chemotaktische Aktivierung durch Entzündungsmediatoren führt zu einer blitzartigen Actin-Polymerisierung in den Granulozyten und gleichzeitig zu einem Rearrangement der Integrine an deren Oberfläche, was eine Verbindung der Integrine zum Zytoskelet vermuten lässt. Die Folge ist, dass die Granulozyten adhäsiv werden [184].

Leukozyten-Integrine interagieren hauptsächlich mit endothelialen Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie. Das Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, Syn.: CD54) ist der wichtigste physiologische Ligand für LFA-1 auf dem Endothel. Es wird aber auch noch auf einem breiten Spektrum anderer Zellen exprimiert. Seine Synthese wird massiv durch Zytokine stimuliert (TNF- α , IL-1). Ohne Entzündungsreaktion ist es nur auf wenigen Zelltypen zu finden [276]. ICAM-1 besitzt eine kurze

zytoplasmatische Kette, über die es mit dem endothelialen Zytoskelet interagieren kann. Ein alternativer Ligand für LFA-1 ist ICAM-2. Im Gegensatz zu ICAM-1 wird ICAM-2 auch ohne Entzündungsreaktion auf Endothelzellen gefunden. Zytokine erhöhen die Bildung und Expression von ICAM-2 nicht. Daher wird eine Bedeutung von ICAM-2 bei der Lymphozyten-Rezirkulation angenommen [277]. Mac-1 bindet sowohl mit ICAM-1 als auch mit Liganden, die nicht zur Immunglobulinklasse gehören (Fibronectin, Fibrinogen, Faktor X). VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) aus der Immunglobulin-Superfamilie ist endothelialer Hauptligand für das $\beta 1$ -Integrin VLA-4 (very late antigen 4, $\alpha_4\beta_1$). Es wird auf zytokinstimulierten Endothelzellen in einer Kinetik ähnlich dem ICAM-1 exprimiert. Dieser Mechanismus stellt einen zweiten Lymphozyten/Endothel-Adhäsionsmechanismus dar.

Die Migration der Leukozyten ins Gewebe erfolgt in Richtung der größten Konzentration chemotaktischer Substanzen (Chemotaxis). Ein alternativer Mechanismus ist die Haptotaxis. Hier bewegen sich die Zellen in Richtung der höchsten Adhäsivität [277]. Ein Schlüsselmolekül der transendothelialen Migration ist das PECAM-1 (Platelet-endothelial cell adhesion molecule, CD31). Es wird von Endothelzellen und Leukozyten gleichermaßen konstitutiv exprimiert. Eine Blockade von PECAM-1 mit monoklonalen Antikörpern verhindert die Leukozytendiapedese, nicht jedoch die Adhärenz.

Die extravasierten Leukozyten benötigen in der Regel weitere aktivierende Stimuli (Immunkomplexe, lösliche Mediatoren), um ihre schädigende Wirkung im Gewebe zu entfalten. Diese sind in der Sepsis im Übermaß vorhanden. Zudem sind adhärenente Leukozyten sensibler gegenüber exogenen Aktivatoren als in Suspension befindliche Zellen (outside in-signaling [134]). Infolge der Verengung des Interzellularraumes durch die Leukozyten können z.B. im Lungengewebe makromolekulare physiologische Inhibitoren aus dem Intravasalraum nicht mehr wirken (microenvironment theory [122]).

Die molekularen Vorgänge der jetzt einsetzenden Gewebeschädigung hängen insbesondere mit der Generation von ROS (s.o.) zusammen. Aber auch LEI-unabhängige Prozesse spielen eine Rolle. Die weiteren aktivierten humoralen und zellulären Kaskadensysteme induzieren ebenso Gewebeschädigung. So kommen aus dem Komplementsystem die Anaphylatoxine C3a und C5a. Fibrinospaltprodukte führen zu einer Permeabilitätssteigerung der Endothelbarriere [285]. Ebenso wirken bestimmte Metabolite der Arachidonsäure (Eicosanoide). Vasoaktive Substanzen werden auch von Thrombozyten freigesetzt. Abschließend sei noch die direkte Toxizität von Endo- aber auch Exotoxin genannt.

2.2 Sepsismodelle

Der Tierversuch ist ein unverzichtbares Bindeglied zwischen molekular- bzw. zellbiologischen Untersuchungen und klinischen Studien. Er vereint die Möglichkeit der Aufklärung von Pathomechanismen mit der Option der Entwicklung von Therapieformen. Der Vorteil von Tierexperimenten ist die Chance, unter reproduzierbaren Verhältnissen kausale Untersuchungen am Gesamtorganismus durchzuführen.

Die Besonderheit bei der Entwicklung von tierexperimentellen Sepsismodellen ist, dass das klinische Bild, welches simuliert werden soll, sich als sehr komplex und uneinheitlich darstellt. Die Schwierigkeiten bei der Definition der Krankheitsentität wirken sich zwangsläufig auch auf die Gültigkeit von Tiermodellen aus. Hinzu kommen die allgemeinen Limitationen von Tierversuchen, wie speziesabhängige Unterschiede in der Reaktion auf exogene Noxen, unterschiedliche anatomische und metabolische Charakteristika u.a., die in einer schwierigen Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf den Menschen resultieren.

In der Literatur werden im wesentlichen zwei Verfahren benutzt, um tierexperimentell pathophysiologische Veränderungen zu erzielen, die denen der Sepsis ähnlich sind. Dies sind erstens Modelle mit vitalen Infektionserregern, die entweder von außen in den Organismus eingebracht werden oder innerhalb des Organismus freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu existieren eine Vielzahl von Sepsismodellen mit Verabreichung von Endotoxin (Lipopolysaccharid) - einem Zellmembranbestandteil gram-negativer Bakterien – auf verschiedenen Applikationswegen. Diese Versuchsanordnungen sollten korrekterweise als Endotoxinmodelle (endotoxicosis) bezeichnet werden. Ebenso können auch andere Toxine verabreicht werden. Je nach Dosis und Zeitraum der Applikation können bei allen Verfahren akute oder chronische sepsisähnliche Zustände hervorgerufen werden.

Modelle mit vitalen Infektionserregern lassen sich in vier Gruppen einordnen [316]. Die erste Gruppe wird von Versuchen mit Weichteilinfektionen als Sepsis-Fokus gebildet. Bereits 1964 beschrieben *Albrecht et al.* [5] ein Modell der hyperdynamen Sepsis als Folge eines definierten Oberschenkelabszesses und *Walker et al.* ein Hautabszessmodell mit *Pseudomonas aeruginosa* [312]. Die zweite Gruppe von Tiermodellen benutzt die Implantation von Faeces oder lebenden Erregern in die freie Bauchhöhle [4; 46]. Hier kann das klinische Bild einer Peritonitis, eine der häufigsten Sepsis-Ursachen, simuliert werden.

Diese Modelle zeichnen sich durch einen protrahierten Krankheitsverlauf aus und beginnen oft wie beim Menschen mit einer hyperdynamen Phase. Den dritten Komplex bilden Studien mit parenteraler Applikation lebender Mikroorganismen. Besonders häufig wird hier *Escherichia coli* eingesetzt [4].

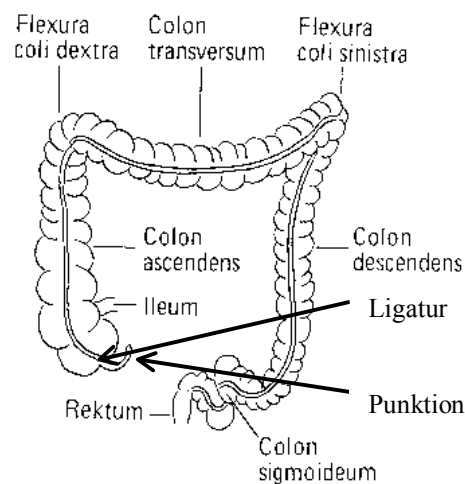


Abb. 8: Cecal ligation and puncture - Modell zur Sepsis-Induktion

Schließlich ist als viertes das CLP-Modell (cecal ligation and puncture, Abbildung 8) zu nennen. Dieses Modell wurde erstmals 1980 von *Wichterman et al.* [316] beschrieben und wird seitdem sehr häufig benutzt. Die Entwicklung der Peritonitis-Symptomatik nach Darmperforation im CLP-Modell benötigt einen längeren Zeitraum und ähnelt somit stark dem klinischen Verlauf, ist aber gleichzeitig mit einer notwendigen längeren Anwartszeit verbunden. Nachteilig im CLP-Modell ist die relativ schlechte Quantifizierbarkeit der exakten Dosis und der Art sepsisauslösender Mikroorganismen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Darmlumen in die Bauchhöhle übertreten.

Endotoxin wird experimentell in der Regel intraperitoneal oder intravenös verabreicht. Hierbei ist es von wesentlicher Bedeutung, ob die Applikation bolusartig oder kontinuierlich erfolgt und ob eine adäquate Volumentherapie durchgeführt wird. Die intraperitoneale

Endotoxingabe unterscheidet sich klinisch nicht essentiell von den obengenannten intraperitonealen Infektionsmodellen. *Fink* et al. beschrieben ein Kaninchenmodell mit intraperitonealer LPS-Bolusgabe, das nach 16-18 Stunden hämodynamisch große Ähnlichkeiten mit der Frühphase der humanen Sepsis (erhöhtes Herzzeitvolumen, erniedrigter peripherer Widerstand, Zunahme des portalen Blutflusses) zeigt [78]. Die intravenöse Endotoxininfusion ist am besten geeignet, kurzfristig verschiedene Sepsis-Phasen zu modellieren. In niedrigen Dosen verabreicht, ruft Endotoxin bei verschiedenen Spezies ein hyperdynamisches Sepsisbild hervor [42]. In höheren Dosen kann ein hypodynamisches Bild mit erhöhten peripheren Widerständen und erniedrigtem Herzzeitvolumen ausgelöst werden [144].

Auch das Endotoxin-Modell unterliegt Einschränkungen. Als Nachteil gilt, dass nur ein Bakterienbestandteil und kein vollwertiges Bakterium als "Agens" dient, wohingegen z.B. im CLP-Modell native Darmbakterien des verwendeten Versuchstieres als "Agens" dienen. Es sind Sensitivitätsunterschiede verschiedener Tierspezies gegenüber dem Endotoxin und verschiedenen Versuchsdesigns zu beachten [64; 77; 256; 260; 286; 321; 328].

In vielen Untersuchungen wurde die pathophysiologische Bedeutung der Endotoxinämie bestätigt. In einer Studie von *Danner* et al. wurden LPS-Messungen an 110 kritisch kranken Patienten vorgenommen. Eingeschlossen waren 100 Patienten mit einer bewiesenen oder vermuteten Sepsis (Gruppe 1) und 10 Patienten mit einem Schock anderer Genese (Gruppe 2). LPS wurde in Blutproben von Gruppe 1 in 43% der Fälle, in Gruppe 2 dagegen nur in 10 % der Fälle gefunden [61]. Zusätzliche Hinweise für die pathophysiologische Bedeutung des LPS in der Sepsis stammen aus Studien an freiwilligen Probanden. Hierbei konnten mit sehr kleinen LPS-Dosen (4 ng/kg KG) hämodynamische, hämatologische und metabolische Veränderungen erzeugt werden, die in qualitativer Hinsicht den bei septischen Patienten zu beobachtenden pathophysiologischen Veränderungen ähneln. Beobachtet wurden unter anderem Tachykardie, Blutdruckabfall, Fieber, Leukozytose, Lymphopenie sowie ein erhöhtes Herzminutenvolumen [242].

Ein Vorteil des Endotoxin-Modells im Vergleich mit dem CLP-Modell ist die genauere Quantifizierbarkeit der "challenge"-Dosis. Damit verbunden ist ein exakt reproduzierbarer Symptom-Zeit-Verlauf. In Abhängigkeit von der verwendeten Endotoxin-Dosis können laborchemische Veränderungen, pathophysiologische und klinische Symptome

schon 30 - 45 Minuten nach Applikation des Endotoxins beobachtet werden [323]. Die Handhabung des LPS ist einfach und ermöglicht eine Minimierung des organisatorischen und logistischen Versuchsaufwandes. Als Fazit kann gelten: LPS ist in der Lage, diejenigen Pathomechanismen anzustoßen, welche letztlich die klinischen Symptome, biochemischen Veränderungen und Organdysfunktionen erzeugen, die auch bei der Sepsis beobachtet werden [47; 78; 237].

2.3 *Therapeutische Optionen*

Analog zu den kaskadenhaften Abläufen in der Pathogenese der Sepsis kann eine Therapiekaskade aufgestellt werden [264]. In der klinischen Praxis erscheint oftmals der frühzeitige kombinierte Einsatz von Behandlungsmaßnahmen indiziert. Alle Therapiestrategien sollten jedoch mit den Mitteln der Ergebnisforschung (evidence-based medicine) validiert werden [55; 268]. Dazu ist das Vorliegen systematischer Studien an großen Patientenkollektiven notwendig. Dies ist in vielen Bereichen der Sepsis-Behandlung noch nicht der Fall. Übereinstimmung besteht darin, dass die Herdsanierung die unabdingbare Basis der Sepsis-Therapie darstellt. Als weitere Säule der Therapie gelten antiinfektiöse Maßnahmen, wobei die Relevanz antibiotikainduzierter Endotoxin- und Zytokinfreisetzung noch nicht ausreichend untersucht ist. Die dritte Säule der Sepsistherapie ist die supportive Behandlung der Organdysfunktionen, ein Bereich, in dem enorme Fortschritte erzielt werden konnten. Als vierte Säule entwickelt sich die Unterbrechung des Toxin-Mediator-Netzwerkes durch Neutralisation, Antagonisierung, Elimination, antiinflammatorische und immunmodulatorische Substanzen. Diese therapeutische Option kombiniert mit dem Anliegen der Protektion der intestinalen Mikrozirkulation (dritte Säule) stellte die Leitlinie für die Auswahl der Substanzen in den vorliegenden Untersuchungen dar.

2.3.1 Antioxidative Substanzen

Dem Organismus stehen wirksame Schutzmechanismen gegenüber radikalischer Belastung zur Verfügung. Die drei wichtigsten endogenen Enzymsysteme im Gewebe sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase und die Glutathionperoxidase [252]. Die Vitamine C und E stellen bedeutende nichtenzymatische Antioxidantien dar [50; 171]. Infolge ihrer unterschiedlichen Wasser- und Lipidlöslichkeit sind die endogenen Antioxidantien für bestimmte Kompartimente zuständig (Membranen, Zytoplasma, Extrazellulärraum). Schäden im Organismus treten nur dann auf, wenn diese Schutzsysteme unzureichend ausgebildet oder durch eine verstärkte Entstehung von Radikalen überlastet sind. Aus *in vivo*-Studien ist bekannt, dass es unter Applikation von Bakterien oder Endotoxin zu einer starken Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in zahlreichen Organen, wie Dünndarm, Magen, Lunge und Leber kommt [205; 211; 323]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass unter endotoxämischen Bedingungen die Aktivität der SOD in einigen Organen, z.B. der Lunge, abnimmt. Im Magen wurde unter identischen Bedingungen eine Zunahme (Induktion) beobachtet. Im Dünndarm traten keine Veränderungen der SOD-Aktivität auf [323]. Somit ist eine differenzierte Reaktion verschiedener Organe auf radikalischen Stress zu beobachten. Therapeutisch bestehen zwei prinzipielle Möglichkeiten, die radikalische Belastung des Organismus zu senken. Entweder man versucht die Radikalbildung einzudämmen - z.B. durch kompetitive Hemmung radikalgenerierender Enzyme - oder bereits gebildete Radikale werden abgefangen (radical scavenging). Als Beispiel für die erste Option ist das von uns untersuchte Oxypurinol zu nennen. Das ebenfalls von uns untersuchte 21-Aminosteroid U-74389G wirkt als Radikal-Scavenger über den zweiten Weg.

2.3.1.1 Oxypurinol

Allopurinol und Oxypurinol sind Isomere des Hypoxanthins bzw. Xanthins. Beide Substanzen können (Allopurinol nach Oxidierung zum länger wirksamen Metaboliten Oxypurinol) eine feste Bindung mit der Xanthinoxidase eingehen und das Enzym dadurch hemmen. Die Bildung von Superoxidanionen und letztlich Wasserstoffperoxid wird verhindert [332]. In Dosen von 30-50 mg/kg KG kann Oxypurinol auch direkt als ein Hydroxylradikalfänger agieren [196; 201].

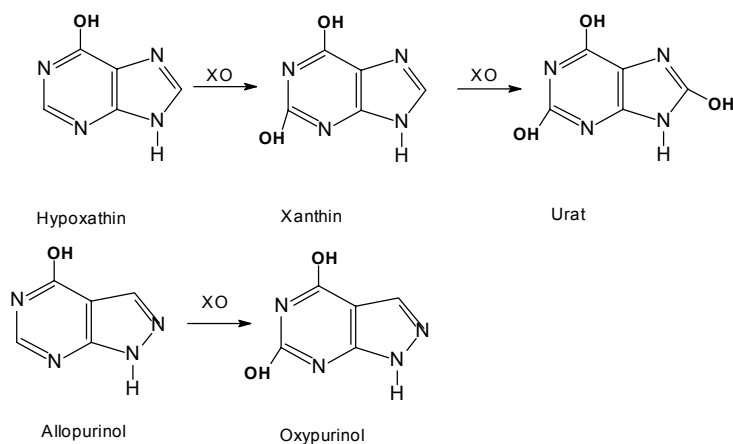


Abb. 9: Natürliche Metabolite und pharmakologische Inhibitoren der Xanthinoxidase

2.3.1.2 Lazaroide

Als „Lazaroide“ bezeichnet man die 21-Aminosteroiden (benannt nach dem biblischen Bettler Lazarus, der sich von den Abfällen der Reichen ernährte [Lukas 16, 19-31]). Solche „Abfallprodukte“ des Stoffwechsels sind z.B. reaktive Sauerstoffspezies. Lazaroide binden insbesondere Lipidperoxyl- und Phenoxyradikale und können dadurch einer möglichen Gewebeschädigung entgegenwirken. Sie hemmen effektiv die eisenabhängige Lipidperoxidation, sind aber auch in eisenfreier Umgebung wirksame Antioxidantien [115]. Zusätzlich haben 21-Aminosteroiden einen membranstabilisierenden Effekt. Diese kombinierte Wirkung hemmt die sterische Ausbreitung eines ROS-Angriffes auf zelluläre Membranen. Spezifische glukokortikoide oder mineralokortikoide Wirkungen besitzen die 21-Aminosteroiden nicht [43; 43].

Eine der ersten derartigen Substanzen war U-72099E, ein Non-Glukokortikoid mit antioxidativen Effekten im Hochdosisebereich. In die Klinik Eingang gefunden hat das 21-Aminosteroid U-74006F (Tirilazad mesylate). In experimentellen Untersuchungen wird häufig das Lazaroid U-74389G (Abb. 10) eingesetzt.

Inzwischen gibt es weitere 21-Aminosteroiden, wie das hochwirksame U-74500A, welches wegen galenischer Probleme pharmazeutisch bisher nicht verwertbar war, und die Lazaroide

der 2. Generation (z.B. U-78517F) mit Tokopherol-ähnlicher Struktur.

Kennzeichnend für die Effekte der Lazaroiden ist die Existenz eines Dosisoptimums (u-shaped action, [116]).

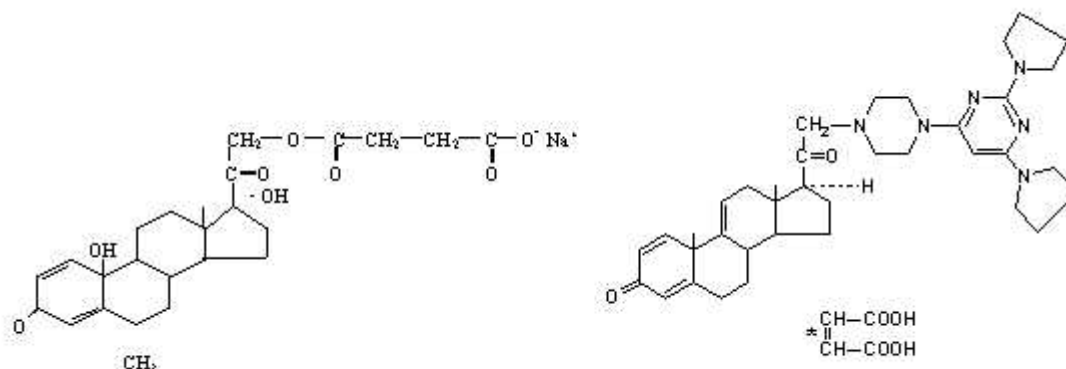


Abb. 10: 6α-Methylprednisolon (links) und das 21-Aminosteroid U-74389G (rechts)

2.3.2 Vasoaktive Substanzen

Vergleichbar mit den antioxidativen Schutzsystemen gehören auch vasoaktive Substanzen zum Arsenal der körpereigenen Regulationsmechanismen zur Wiederherstellung der Homöostase bei oder nach Abweichungen vom Normzustand. Überschreiten die Abweichungen die Grenze der Restitutionskapazität, so kommt es zum Zusammenbruch der Systeme, d.h. im Falle der Vasoregulation zum (septischen) Schock. Die physiologische Kreislaufzentralisation erreicht die Grenzen der Effektivität. Die endogenen Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowie die anderen endogenen vasoaktiven Substanzen (z.B. Eicosanoide, Endothelin, NO-System) können den Kreislauf nicht mehr stabilisieren. Ohne Eingriff von außen ist damit die Sauerstoffversorgung aller Organe akut gefährdet. Außerdem tritt im septischen Schock eine Distributionsstörung im Bereich der Mikrozirkulation verschiedener Organe durch ein Nebeneinander von inadäquater Vasodilatation und –konstriktion auf (mismatch). Daneben kommt es zu metabolischen Störungen in der Sauerstoffverwertung, so dass trotz adäquater Perfusion Ischämieerscheinungen resultieren können. Klinisch resultiert daraus meist ein erniedrigter

peripherer Gefäßwiderstand, der aber auch bei erhöhtem Herzminutenvolumen nicht darüber hinwegtäuschen darf, dass Gebiete mit nicht ausreichender Perfusion existieren. Zeichen der Organdysfunktion werden manifest. Die Basistherapie des septischen Schocks mit Volumen und Vasokonstriktoren kann zwar kurzfristig den Blutdruck stabilisieren, es erscheint jedoch sinnvoll, gezielt auch vasodilatatorische Substanzen einzusetzen, um die durch mismatch und metabolische Störungen gekennzeichnete Mikrozirkulation wichtiger Organe zu verbessern. Dafür sind verschiedene Substanzgruppen geeignet [174; 176; 202]. Einerseits bieten sich Katecholamine und deren Derivate an, die aufgrund der Rezeptorenverteilung organspezifisch eingesetzt werden können. Zum anderen können auch weniger organspezifisch wirksame vasoktive Substanzen verwendet werden. Hier spielen die Prostaglandine eine wichtige Rolle. Im septischen Geschehen treten oft Imbalancen im Eicosanoidstoffwechsel auf. Die resultierenden Störungen im Bereich der Mikrozirkulation könnten somit kausal behandelt werden.

2.3.2.1 Dopexamin

Dopexamin ist ein synthetisches Analogon des endogenen Katecholamins Dopamin. Ähnlich wie Dopamin bewirkt es über DA1-Rezeptoren eine Relaxierung der glatten Gefäßmuskulatur, besonders im Splanchnikusgebiet und in der Niere, und somit eine Vasodilatation in den betreffenden Stromgebieten. Über DA2-Rezeptoren hemmt es die Wiederaufnahme von Noradrenalin in sympathischen Nervenfasern. Die Potenz von Dopexamin an peripheren Dopamin-Rezeptoren wird mit 1/3 der Potenz von Dopamin angegeben [44].

Über die Stimulation von β_2 -Rezeptoren vermittelt es außerdem eine Relaxierung der glatten Muskulatur in Bronchialsystem und Magen-Darm-Trakt und vor allem eine arterielle Vasodilatation. Hier ist es deutlich potenter als Dopamin. Die Effekte am β_1 -Rezeptor sind dagegen gering ausgeprägt. Herzfrequenz- und myokardiale Kontraktilitätssteigerung, die eine Erhöhung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs mit sich bringen, treten somit weniger hervor. Indirekt kommt es jedoch zu einer leichten β_1 -Stimulation durch die Inhibition der neuronalen Noradrenalinaufnahme (Uptake-1-Inhibition). Das Herzminutenvolumen nimmt durch die Verringerung des systemischen Gefäßwiderstands zu. Dem Vasodilatationseffekt auf den Blutdruck wirkt die dezente Inotropiesteigerung entgegen.

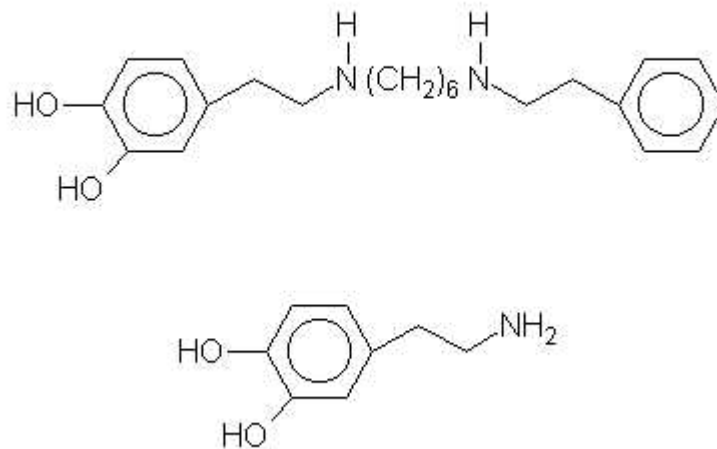


Abb. 11: Strukturformeln von Dopexamin (oben) und Dopamin (unten)

Der wesentliche Unterschied zum Dopamin besteht in der fehlenden Wirkung am α -Rezeptor. Damit verursacht Dopexamin keinerlei Vasokonstriktion, die die obengenannten Effekte antagonisieren würde.

In Deutschland zugelassen wurde das Präparat zur Behandlung der schweren Herzinsuffizienz, die mit konventioneller Therapie nicht befriedigend behandelbar ist.

2.3.2.2 Iloprost

Iloprost ist ein synthetisches Prostacyclinanalogon. Prostacyclin (Epoprostenol, Prostaglandin I_2 , PGX) ist ein endogener Arachidonsäuremetabolit (Eicosanoid). Arachidonsäure (Eicosapentaensäure) findet sich vor allem in den Phospholipiden der Zellmembran. Unter bestimmten physiologischen und / oder pathologischen Bedingungen werden aus Arachidonsäure über den Lipoxygenaseweg Leukotriene gebildet. Durch die Cyclooxygenase entstehen Prostaglandinendoperoxide (PGG₂, PGH₂), Ausgangsmoleküle für die Bildung von Prostaglandinen in verschiedenen Geweben, die Synthese von Thromboxan A₂ in Thrombozyten und von Prostacyclin im Gefäßendothel. Alle Eicosanoide sind lokal wirksame Hormone mit relativ kurzer Wirkungszeit, welche die Aktivität der Zellen, in denen sie synthetisiert werden und die der Nachbarzellen verändern.

Prostacyclin wird durch die Prostacyclinsynthetase aus dem Prostaglandinendoperoxid PGH_2 gebildet. Es handelt sich dabei um einen zyklischen Enolether, der starke vasodilatierende und thrombozytenaggregationshemmende Wirkungen besitzt. Außerdem wird die Leukozytenadhärenz gehemmt und ein zytoprotektiver Effekt beschrieben. Die Halbwertszeit von Prostacyclin ist jedoch mit ca. 3 Minuten sehr gering. Es wird rasch zu 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ metabolisiert.

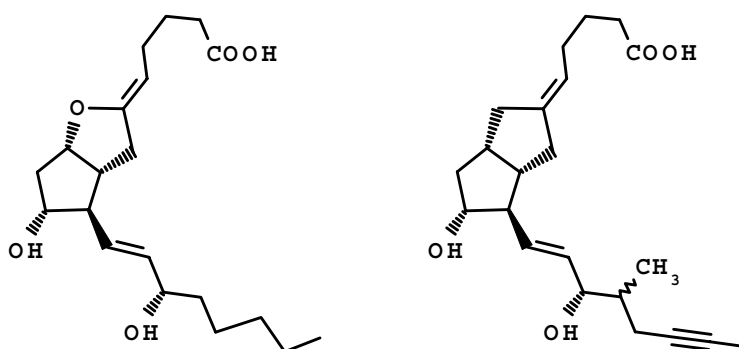


Abb. 12: Strukturformeln von Prostacyclin (links) und Iloprost (rechts)

Die Suche nach einem stabilen Prostacyclinanalogon führte zur Synthese von Iloprost. Es stellt ein Carbazyklinderivat des Prostacyclins dar. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt ca. 30 Minuten. Das pharmakologische Profil ähnelt stark dem des endogenen Epoprostenol. Im Gegensatz zum Epoprostenol ist bei Iloprost jedoch die antiaggregatorische Wirkung um den Faktor 2-7 höher als die vasodilatative Wirkung. Damit wurde eine Limitation des klinischen Gebrauchs von Epoprostenol reduziert. Iloprost ist für die fortgeschrittene Thrombangiitis obliterans mit schweren Durchblutungsstörungen, bei denen eine Revaskularisierung nicht angezeigt ist, in Deutschland zugelassen.

2.4 Monitoring

Das klinische Monitoring kritisch kranker Patienten hat sich in den letzten Jahren ständig verbessert. Dank hochentwickelter bettseitiger Mess- und Analysegeräte ist es heute möglich, einen tieferen Einblick in die Pathophysiologie der Krankheitsbilder und eine globale Standortbestimmung in der Therapie zu erhalten. Für den Bereich der intestinalen Zirkulation steht jedoch nur ein enges Spektrum an Monitoringverfahren zur Verfügung. Dies liegt zum einen an der schweren Zugänglichkeit des Organsystems und zum anderen – eng damit verbunden – in den noch lückenhaften Erkenntnissen zur Bedeutung des Intestinums im septischen Geschehen.

Das Monitoring eines Organsystems soll in der Regel Struktur und / oder Funktion überwachen und Störungen frühzeitig aufdecken. Die Struktur des Intestinums kann klinisch, radiologisch, minimal invasiv endoskopisch oder offen chirurgisch (optisch / bioptisch) eingeschätzt werden. Eine kontinuierliche Überwachung der Gesamtfunktion ist nicht möglich. Funktionsuntersuchungen betreffen einzelne Teilaspekte. Sie können diskontinuierlich (z.B. Resorptionstests) oder kontinuierlich (z.B. Tonometrie) erfolgen. Zählt man die Leber mit zum Gesamtkomplex Splanchnikusgebiet, so kommen noch Eliminationstests (z.B. ICG-Clearance) und Syntheseuntersuchungen hinzu.

Spezielle Fragestellungen können nur mit experimentellen Methoden beantwortet werden. Dafür ist der Tierversuch unabdingbar. Hier können intravitale Mikroskopierv Verfahren, wie in dieser Arbeit durchgeführt, eingesetzt und so dynamische Veränderungen auf der Gewebeebene visualisiert werden. Zusätzliche Möglichkeiten bieten sich durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkierung oder spezifischen Antikörpern. Experimentell können verschiedene Messtechniken zur Quantifizierung der intestinalen Perfusion benutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Laser-Doppler-Flowmetrie angewandt. Weitergehende Untersuchungen setzen isolierte Darmpräparate, Teile der Darmwand (*Ussing*-Kammer) oder intestinale Zellpopulationen ein.

Ein Surrogat des Monitorings in der klinischen Praxis ist die Schaffung von Scoring-Systemen. Sind pathophysiologisch wesentliche Parameter erfasst, so korrelieren sie sehr gut mit dem klinischen Verlauf. Im Tierversuch kann das Protokoll derart gestaltet werden, dass unmittelbare Zusammenhänge von Therapiestrategien und Mortalität aufgedeckt werden (Outcome-Studien). In der vorliegenden Studie stand dies nicht im Vordergrund. Vielmehr sollten intravitale Veränderungen evaluiert werden.

3 Fragestellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie. Ausgangspunkt für die Wahl der Thematik war die Erkenntnis, dass das Intestinum eine wesentliche Rolle bei der Genese und Propagation des septischen Multiorganversagens spielt. Mit der Protektion des Intestins wurde eine Stabilisierung des Gesamtzustandes in der Sepsis angestrebt.

Dazu wurden zwei therapeutische Optionen evaluiert. Zum einen wurde eine systemische Behandlung mit antioxidativen Substanzen und zum anderen die Gabe von vasoaktiven Medikamenten in Bezug auf die intestinale Mikrozirkulation und die Mediatorfreisetzung bei verschieden starker Endotoxinbelastung untersucht.

3.1 Fragestellung Teil 1

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) stellen einen terminalen Mediator in der Kaskade der endotoxininduzierten Gewebeschädigung dar. Als Hauptquelle reaktiver Sauerstoffradikale in der Sepsis werden die Leukozyten angesehen. Eine bedeutende ROS-Quelle ist auch das Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenase-System. Zwischen beiden Mechanismen gibt es Wechselwirkungen, die zu einer gegenseitigen Aktivierung führen. ROS sind außerdem potente Induktoren z.B. des nukleären Faktors κB , so dass es wiederum zu einer Perpetuierung der Mediatorfreisetzung (z.B. $TNF-\alpha$) und einer weiteren Leukozytenaktivierung im Sinne eines *circulus vitiosus* kommt. Physiologischerweise inhibieren endogene Antioxidantien die ROS-Wirkung. Im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion reicht die endogene antioxidative Kapazität jedoch nicht aus, so dass es zur deletären Gewebeschädigung kommt.

Therapeutisch bestehen zwei prinzipielle Möglichkeiten, die radikalische Belastung des Organismus zu senken. Entweder wird versucht, die Radikalbildung einzudämmen, z.B. durch Hemmung radikalgenerierender Enzyme oder bereits gebildete Radikale werden abgefangen (radical scavenging). Als Beispiel für die erste Option wählten wir die Substanz Oxypurinol, ein Allopurinolabkömmling und kompetitiven Hemmer im Xanthinoxidase-

Xanthindehydrogenase-System. Desweiteren untersuchten wir den Effekt des 21-Aminosteroids U-74389G - eines Radikal-Scavengers.

Ziel war es, die Auswirkungen der Gabe von Oxypurinol bzw. U-74389G auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung bei experimenteller Endotoxinämie zu untersuchen.

Die Untersuchung der intestinalen Mikrozirkulation erfolgte mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurde die funktionelle Kapillardichte als Parameter für die Integrität der Kapillarperfusion und das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der submukösen Venolen als Maß für die Leukozytenaktivierung bestimmt. Die Gesamtperfusion der Darmwand wurde mittels der Laser-Doppler-Flowmetrie untersucht.

Als primärer Mediator im septischen Geschehen wurde der Tumornekrosefaktor- α im Serum analysiert. Als Marker für die Wirkung freier Sauerstoffradikale wurde das Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd bestimmt.

3.2 Fragestellung Teil 2

Im septischen Schock tritt eine Distributionsstörung im Bereich der Mikrozirkulation verschiedener Organe auf. Sie kommt zustande durch ein Nebeneinander von inadäquater Vasodilatation und –konstriktion in der Endstrombahn (mismatch). Andererseits kommt es zu metabolischen Störungen in der Sauerstoffverwertung, so dass trotz adäquater Perfusion Ischämieerscheinungen resultieren können. Durch die Basistherapie des septischen Schocks mit Volumengabe und Vasokonstriktoreinsatz kann der Blutdruck kurzfristig stabilisiert werden. Es erscheint jedoch sinnvoll, gezielt auch vasodilatatorische Substanzen einzusetzen, um die durch „mismatch“ und metabolische Störungen gekennzeichnete Mikrozirkulation wichtiger Organe zu verbessern.

Die Verbesserung der Perfusion kann mit verschiedenen Substanzgruppen erzielt werden. Einerseits bieten sich Katecholamine und deren Derivate an, die aufgrund der Rezeptorenverteilung auch organspezifisch eingesetzt werden können. Wir untersuchten wegen des besonderen Wirkprofils im Splanchnikusgebiet das synthetische Katecholamin Dopexamin. Zum anderen können auch weniger organspezifisch wirksame vasotaktive Substanzen verwendet werden. Hier spielen die Prostaglandine eine wichtige Rolle. Im septischen Geschehen treten oft Imbalancen im Eicosanoidstoffwechsel auf. Die

resultierenden Störungen im Bereich der Mikrozirkulation könnten somit kausal behandelt werden. Wir setzten im Rahmen unserer Studie Iloprost, ein stabiles Prostacyclinanalogon, ein.

Dabei war Ziel der Untersuchung, die Effekte einer Therapie mit Dopexamin bzw. Iloprost in Bezug auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung bei experimenteller Endotoxinämie zu evaluieren.

Die Untersuchung der intestinalen Mikrozirkulation erfolgte wiederum mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die funktionelle Kapillardichte diente als Parameter für die Integrität der Kapillarperfusion und das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der submukösen Venolen als Maß für die Leukozytenaktivierung. Die Gesamtperfusion der Darmwand wurde ebenfalls mittels der Laser-Doppler-Flowmetrie untersucht. Zusätzlich wurden Powerspektralanalysen des systemischen Blutdruckes und des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses durchgeführt, um Informationen über Regulationsprozesse im Bereich des autonomen Nervensystems bei Endotoxinämie und vasoaktiver Therapie zu erhalten. Als systemischer Mediator wurde analog zum ersten Versuchsprotokoll der Serumspiegel des Tumornekrosefaktors- α bestimmt.

4 Methodik

4.1 Versuchstiere

4.1.1 Tiermaterial

Insgesamt wurden in beiden Teilstudien 220 männliche Wistar-Ratten (Gewicht: 190 ± 40 g) im Alter von 6 - 7 Wochen verwendet. Die Versuchsreihen orientierten sich an den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach § 2 sowie § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes [293] und wurden von der zuständigen Berliner Senatsverwaltung für Gesundheit genehmigt (Aktenzeichen: G 0102/91, G 0395/94, G 0496/95, G 0157/98). Die Versuche wurden von Oktober 1994 bis Januar 1999 durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte bei 12-stündigem Hell/Dunkel-Rhythmus (Temperatur: 25°C, Luftfeuchtigkeit: 55-60%). Den Tieren war freier Zugang zu Wasser und Standardnahrung (Altromin®, Altromin, Lage, Deutschland) möglich. Eine Woche nach Anlieferung wurden die Tiere den Versuchen zugeführt. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde den Tieren die feste Nahrung entzogen. Wasser *ad libitum* wurde bis zum Beginn der Versuche gewährt.

4.1.2 Gruppeneinteilung

4.1.2.1 Teil 1 – antioxidative Substanzen

In der Kontrollgruppe (n = 20) wurden die Tiere instrumentiert, laparotomiert und die Untersuchungen ohne sonstige Behandlung durchgeführt (sham operation).

Zwei weitere Kontrollgruppen (je n = 20) wurden gleichfalls instrumentiert und laparotomiert. Sie erhielten außerdem 5 bzw. 20 mg/kg KG Endotoxin (LPS von *E. coli*, Serotyp O55:B5; Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in NaCl 0,9%) als i.v.-Kurzinfusion über 15 min ohne weitere Therapie.

In den vier Therapiegruppen (je n = 20) wurden die Tiere präpariert, erhielten 5 bzw. 20 mg/kg KG Endotoxin und zusätzlich eine Therapie mit U-74389G (Upjohn, Kalamazoo, MI, USA; gelöst in CS-4, Upjohn, Kalamazoo, MI, USA; 3 mg/kg KG i.v. 30 min vor LPS-Gabe, 1,5 mg/kg KG i.v. 60 min nach LPS-Gabe) bzw. Oxypurinol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in 0,1 n NaOH nach *McKechnie* et al. [201]; 50 mg/kg KG i.p. 24 h präoperativ, 20 mg/kg KG i.p. vor LPS-Gabe).

4.1.2.2 Teil 2 – vasoaktive Substanzen

Die Tiere in den vier Therapiegruppen (je n = 20) wurden präpariert und erhielten nach Applikation von 5 bzw. 20 mg/kg KG Endotoxin entweder Iloprost (Ilomedin[®], Schering, Berlin, Deutschland; 50 µg/50 ml NaCl 0,9%; 2 ng/kg/min i.v.) oder Dopexamin (Dopacard[®], Ipsen Pharma, Ettlingen, Deutschland; 50 mg/50 ml NaCl 0,9%; 0,5 µg/kg/min i.v.). Als Kontrollgruppen dienten die ersten drei Gruppen aus Teil 1.

In jeder Gruppe wurden 10 Tiere intravital mikroskopiert und 10 Tiere mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) untersucht. Bei den Tieren mit LDF wurde eine Powerspektralanalyse von Blutdruck- und Lasersignal durchgeführt. Die Blutentnahmen erfolgten bei allen Tieren (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung und Untersuchungen (IVM = Intravitalmikroskopie, LDF = Laser-Doppler-Flowmetrie, LAZ = Lazaroid U-74389G, OXY = Oxypurinol, ILO = Iloprost, DPX = Dopexamin; MDA = Malondialdehyd, PSA = Powerspektralanalyse; je n = 20)

Gruppen	Monitoring	Spezielle Untersuchungen
Kontrollgruppe	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA, LDF, PSA
LPS 5	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA, LDF, PSA
LPS 20	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA, LDF, PSA
LPS 5 + LAZ	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA
LPS 5 + OXY	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA
LPS 20 + LAZ	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA
LPS 20 + OXY	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , MDA
LPS 5 + ILO	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , LDF, PSA
LPS 5 + DPX	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , LDF, PSA
LPS 20 + ILO	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , LDF, PSA
LPS 20 + DPX	Hf, MAP, BGA, Laktat, Leuko	IVM, TNF- α , LDF, PSA

4.2 Versuchsmodell

4.2.1 Versuchsablauf

Der allgemeine Versuchsablauf war für alle Gruppen identisch. Die gesamte Präparationsdauer betrug ca. 30 Minuten. Sie beinhaltete das Einlegen der intravasalen Katheter, die Tracheotomie und die mediane Laparotomie. Danach wurde den Tieren eine Erholungsphase von 15 min gewährt. Es folgte die Induktion der Endotoxinämie. Zwei Stunden nach LPS-Applikation wurden die intravitalmikroskopischen Messungen durchgeführt. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen (BE) sind aus Abbildung 13 ersichtlich. Zu den gleichen Zeitpunkten erfolgte die Laser-Doppler-Flowmetrie und die Malondialdehyd-Bestimmung.

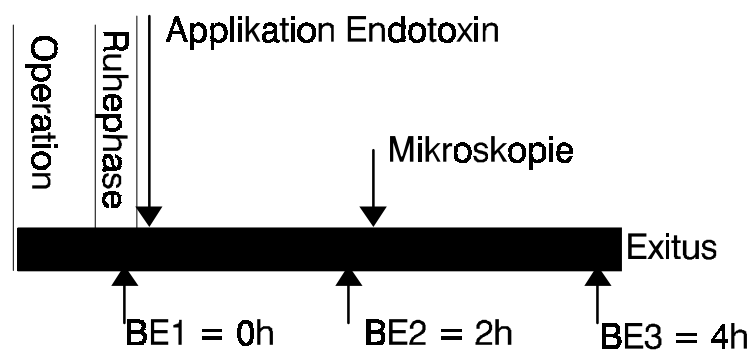


Abb. 13: Versuchsablauf

4.2.2 Anästhesie und Monitoring

Die Narkose wurde mittels Etherrausch (Ether pro narcosi, Hoechst, Frankfurt/M., Deutschland) und nachfolgender intraperitonealer Applikation von 60 mg/kg KG Pentobarbital (Nembutal®, Sanofi, Düsseldorf, Deutschland) eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit einer Erhaltungsdosis von 1 mg/kg KG/h Pentobarbital i.v. und bei Bedarf mit intravenösen Bolusgaben bis 30 mg/kg KG Pentobarbital. Die Narkosetiefe wurde kontinuierlich anhand des Zwischenzehenreflexes und

des Ohrreflexes kontrolliert. Zehn Minuten nach Narkoseeinleitung konnte mit der Operation begonnen werden. Die Fixierung der Tiere erfolgte in Rückenlage. Polyethylenkatheter (PE 50, Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,96 mm, Portex[®], Hythe, Kent, GB) wurden in die linke Vena jugularis interna und linke Arteria carotis communis eingebracht. Es erfolgte ein kontinuierliches Monitoring des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (Hf; BMT Biomonitor 5231, Druckmesswandler W112, RFT, Stassfurt, Deutschland). Mittels eines Infrarotsensors wurde ein kontinuierliches Monitoring der Atemfrequenz vorgenommen. Alle Tiere wurden tracheotomiert, um eine Verlegung der oberen Atemwege auszuschließen. Die Tiere atmeten spontan Raumluft. Eine Wärmematte diente zur Aufrechterhaltung einer Körperkerntemperatur von $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (rektale Thermistorsonde, W 233, RFT, Stassfurt, Deutschland).

Über den zentralvenösen Zugang erfolgte die Volumensubstitution mit Vollelektrolytlösung (Thomaejonin[®], Thomae, Biberach, Deutschland). Es erfolgte eine Differenzvolumensubstitution zu der Gruppe, die am meisten Volumen erhalten hatte (Oxypurinolgruppe), wie in Tabelle 2 dargestellt. Der Differenzbetrag wurde zusätzlich über vier Stunden infundiert. Die Gesamtvolumenzufuhr betrug 7,5 ml/kg KG/h.

Tabelle 2: Berechnung der Volumensubstitution (LPS = Lipopolysaccharid, LAZ = Lazaroid U74389G, OXY = Oxypurinol, ILO = Iloprost, DPX = Dopexamin)

	Kontrolle	LPS	LAZ	OXY	ILO	DPX
Basisinfusion	1 ml/h	1 ml/h	1 ml/h	1 ml/h	1 ml/h	1 ml/h
LPS	-	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
U-74389G	-	-	1 ml	-	-	-
Oxypurinol	-	-	-	1,5 ml	-	-
Iloprost	-	-	-	-	0,08 ml	-
Dopexamin	-	-	-	-	-	0,025 ml
Summe (4 h)	4 ml	4,5 ml	5,5 ml	6 ml	4,58 ml	4,525 ml
Diff. (4 h)	2 ml	1,5 ml	0,5 ml	-	1,42 ml	1,475 ml

4.2.3 Operative Technik

Nach Rasur und Desinfektion der linken Halsseite wurde die Haut über 2 cm von kranial nach kaudal inzidiert und die Vena jugularis interna sin. dargestellt. Nach distaler Ligatur und proximaler Abklemmung der Vene mittels Microclip (Aesculap[®], Tuttlingen, Deutschland) erfolgte die Kathetereinlage in *Venae sectio*-Technik, die Fixierung des Katheters mit Haltefäden und die Entfernung des Microclips. Analog wurde mit der Arteria carotis communis sin. verfahren. Danach erfolgte die Darstellung der proximalen Trachea. Die Trachea wurde mit einer Mikroschere (Aesculap[®], Tuttlingen, Deutschland) quer eröffnet und mit Hilfe einer Venenverweilkanüle (Braunüle[®] G14, Braun, Melsungen, Deutschland) intubiert. Abschließend wurde die Halswunde mit einer fortlaufenden Naht (Ethibond[®], 3,5 metric, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Im Anschluss an die zentralvenöse und arterielle Katheterisierung und die Tracheotomie erfolgte nach Rasur und Desinfektion eine mediane Laparotomie vom Xiphoid bis zur Symphyse. Für die Laser-Doppler-Flowmetrie wurde zur Sonden-Einlage die rechte laterale Bauchwand zusätzlich über 0,5 cm inzidiert. Die Laser-Doppler-Sonde wurde mittels Gewebekleber Enbucrilat (Histoacryl[®], Braun, Melsungen, Deutschland) am terminalen Ileum fixiert. Danach wurde den Tieren eine Erholungsphase von 15 min bis zur Induktion der Endotoxinämie gewährt.

Zwei Stunden nach LPS-Applikation wurden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde ein 5 cm langes Segment des terminalen Ileums proximal der Ileocoecalklappe aufgesucht und auf eine spezielle Haltevorrichtung verbracht. Ein Deckgläschen (21x26 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) diente als transparente und plane Abdeckung der Mikroskopierkammer (siehe Abbildung 15 - Versuchsaufbau). Auf diese Weise wurde ein Darmabschnitt von ca. 1 cm² von serosal mikroskopisch zugänglich. Für die Untersuchung der Mukosa wurde der Darm antimesenterial mittels eines Elektrokauters (BCH 50, TUR, Dresden, Deutschland) eröffnet. Eventuell vorhandener Darminhalt wurde durch Spülung mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Nicht zu untersuchende Darmregionen wurden mit Plastikfolie und Gaze abgedeckt und kontinuierlich mit auf 37°C angewärmter Elektrolytlösung (Thomaejonin[®], Thomae, Biberach, Deutschland) superfundiert, um eine Exposition gegenüber Raumluft sowie eine Austrocknung zu vermeiden. Die Tötung der Tiere erfolgte am Versuchsende mit einer Überdosis Pentobarbital.

4.3 Labor

4.3.1 Leukozyten

Für die Bestimmung der Leukozytenzahl wurden aus dem arteriellen Katheter 150 µl Blut entnommen (Citratblut; Zell-Counter: Technicon H1, Bayer, Leverkusen, Deutschland; Eichung auf Rattenblut).

4.3.2 Laktat

Für die Bestimmung der Laktatkonzentration wurden 50µl Heparinblut benötigt. Die Abnahme erfolgte ebenfalls aus dem arteriellen Katheter (Analysegerät: YSI 2300 STAT-PLUS-S, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA).

4.3.3 Blutgasanalyse

Für die Untersuchung des pH-Wertes, des Kohlendioxidpartialdrucks (pCO₂) und Sauerstoffpartialdrucks (pO₂) wurden 100µl Heparinblut arteriell gewonnen. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte an einem automatischen Blutgasanalysator (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

4.3.4 Tumornekrosefaktor- α

In jeweils 200 µl arteriellem Heparinblut wurde der Tumornekrosefaktor- α bestimmt. Zur Analyse wurde ein monoklonaler, Ratten-spezifischer TNF- α -ELISA-Kit (Factor-Test-X[®], Genzyme, Cambridge, MA, USA; Testsensitivität 10pg/ml) eingesetzt.

4.3.5 Malondialdehyd

Malondialdehyd ($\text{OHC-CH}_2\text{-CHO}$; MDA) ist ein Zerfallsprodukt mehrfach ungesättigter peroxidierten Fettsäuren. Es wirkt als Quervernetzungsagens und wird zur Quantifizierung der radikalischen Belastung laborchemisch im Test auf Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS = thiobarbituric acid reactive substances) mittels HPLC bestimmt.

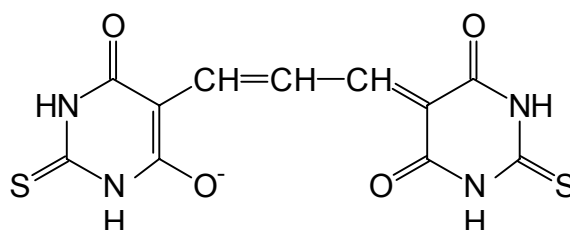


Abb. 14: Verbindung von Malondialdehyd mit dem Nachweisreagenz Thiobarbitursäure

Die MDA-Bestimmung erfolgte aus Dünndarmgewebeproben (gewonnen zum Zeitpunkt 0 h, 2 h, 4 h). Die Aufarbeitung der tiefgefrorenen Gewebeproben erfolgte im Kühlraum bei 4°C. Dort wurden die Gewebeproben mit einem Pistill zerkleinert und in je 5 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben. Die Homogenisierung der Proben wurde im Eisbad in einem Homogenisator nach POTTER-ELVEJEM durchgeführt. Das Homogenisat wurde erneut in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Bestimmung der MDA- Konzentration der Proben erfolgte in Anlehnung an die Methode nach *Wong et al.* [317] in einem Mikromessansatz fluorimetrisch. Zu 50 µl des Homogenisats wurden jeweils 0,75 ml 70%ige Phosphorsäure, 0,45 ml Aqua dest. und 0,25 ml Thiobarbitursäure (TBA)- Lösung gegeben. Für eine Stunde wurden die Proben in geschlossenen Gefäßen bei 95°C im Wasserbad inkubiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Danach wurden die so vorbereiteten Proben mit Methanol-NaOH im Verhältnis von 1:1 neutralisiert. Die Ansätze wurden dann 20 min bei 4°C im Kühlraum geschüttelt und zum Schluss in einer Ultrazentrifuge bei einer Beschleunigung von 1200 g zentrifugiert.

Darauf erfolgte die Separation der organischen Phase, die am Fluoreszenzspektrometer

RF - 551 (Shimadzu, Tokio, Japan; HPLC-Säulen: LC - 18 15cm/4,6mm/5µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA; HPLC - Pumpe: Waters 510, Waters, Milford, MA, USA) bei einer Exzitationswellenlänge von 525 nm und einer Emissionswellenlänge von 550 nm gemessen wurde. Die Berechnung wurde auf Grundlage einer Eichkurve durchgeführt, die für Malondialdehydbisethylacetat (97%) im Bereich von 0 bis 25 nmol/ml (in Essigsäure gelöst) für jedes Experiment bestimmt worden war.

4.4 Intravitalmikroskopie

4.4.1 Technik

Die intravitale Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (Intravitalmikroskopie, IVM; Abbildung 15) erfolgte mit folgender technischer Ausrüstung:

Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Lichtquelle HBO 50, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Okulare 10 x, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Objektiv - 10 x / 0,5; Fluor, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Übersichtsaufnahmen)

Objektiv - 20 x / 0,5; Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Detailaufnahmen)

Filtersatz Nr. 20, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560; Emission: BP 575 - 640) für Beobachtungen mit Rhodamin 6G

Filtersatz Nr. 10, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 450 - 490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 - 565) für Beobachtungen mit FITC-Dextran

Video Kamera: Panasonic WV 1850, Matsushita, Tokio, Japan

Videorecorder: Panasonic AG 6200, Matsushita, Tokio, Japan

Monitor: Philips LDH 2106/00, Philips, Eindhoven, Niederlande

Video Timer: VTG-22, For-A, Tokio, Japan

In der beschriebenen Konfiguration werden 250- bzw. 500fache Vergrößerungen erreicht.

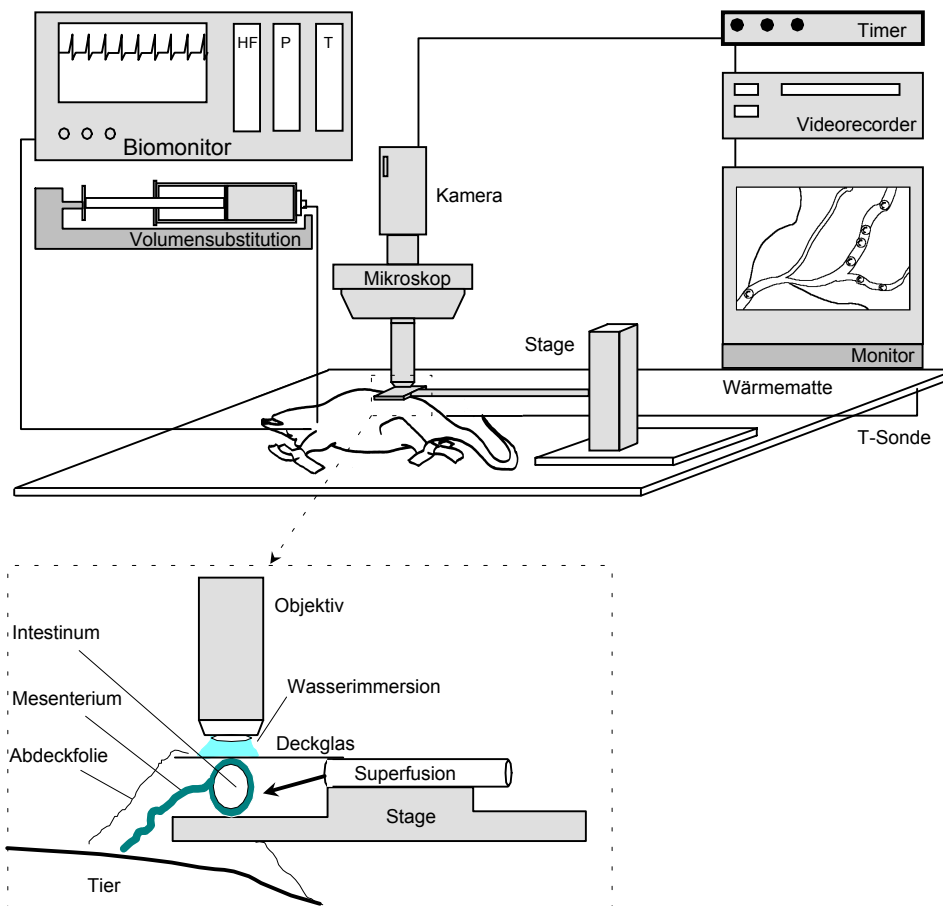


Abb. 15: Versuchsaufbau Intravitalmikroskopie

Zuerst erfolgte die Markierung der Leukozyten mit Hilfe der intravenösen Gabe von 0,017 %igen Rhodamin-6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Lösungsmittel: NaCl 0,9 %). Im Beobachtungszeitraum wurden 2 Boli zu je 200 µl verabreicht. Dadurch wurde eine optimale Darstellung der Leukozyten erreicht.

Mittels Fokussierung wurde am Mikroskop die Submukosa des ausgelagerten Darmabschnittes eingestellt. Es wurden sieben Gesichtsfelder mit unverzweigten, über mindestens 300 µm gestreckt verlaufenden Venolen 1. Grades und sieben Gesichtsfelder mit ebensolchen Venolen 3. Grades (siehe Abb. 16) aufgesucht und für 30 - 60 s aufgezeichnet. Die Dauer der Mikroskopie für diesen Abschnitt betrug etwa 20 Minuten.

Danach erfolgte die Gabe von 200 µl einer 5 %igen FITC-Dextran-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in NaCl 0,9 %). Durch die resultierende Kontrastanhebung des Plasmas ist eine Evaluierung des Kapillarstrombettes möglich. Aufgezeichnet wurden nach Fokussierung wiederum zehn Videosequenzen (30 s) mit Kapillaren der longitudinalen

Muskulatur und zehn Videosequenzen mit Kapillaren der zirkulären Muskulatur (Abbildung 16). Die Dauer der Mikroskopie für diesen Abschnitt betrug zusätzlich 8-10 Minuten.

Anschließend wurde das Darmlumen in einer Länge von 2 cm in Anlehnung an *Bohlen et al.* antimesenterial mit einem Mikrokauter eröffnet [28]. Hierbei wurden gefüllte Abschnitte bevorzugt, um eine Hitzealteration der gegenüberliegenden, mesenterialen Darmwand zu vermeiden [103]. Nach Spülung mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung wurde der Darm erneut auf eine Haltevorrichtung verbracht. Es wurden diejenigen Abschnitte der Mukosa untersucht, die direkt den mesenterialen Gefäßarkaden anliegen. Somit ist die größtmögliche Entfernung zu den Schnittträndern gewählt und eine Alteration dieser Mukosaabschnitte durch die Mikrokauterisierung am geringsten. Es wurden zehn Videosequenzen der Mukosakapillaren von 30 s Länge aufgezeichnet. Die Mikroskopiedauer betrug 8-10 Minuten. Die Gesamtmikroskopiezeit belief sich somit auf ca. 30 - 45 min. Die Auswertung aller Videosequenzen erfolgte off-line am Videomonitor. Folgende Parameter wurden analysiert:

4.4.2 Leukozytenadhärenz

Zur Auswertung gelangten jeweils sieben submuköse Venolen 3. Grades (V3) mit einem Durchmesser von $37,2 \pm 5,5 \mu\text{m}$ und sieben Venolen 1. Grades (V1) mit einem Durchmesser von $70,8 \pm 7,1 \mu\text{m}$ (MW \pm SD; Abb. 16).

Flow temporär mit dem Endothel interagierender Leukozyten (Roller - Flow)

Definition: Anzahl von Leukozyten, die in einem Beobachtungszeitraum von 30 s einen selektierten Gefäßdurchmesser rollend passieren. Die Geschwindigkeit rollender Leukozyten liegt typischerweise bei ca. $50 \mu\text{m/s}$ [184].

Die Anzahl der temporär mit dem Endothel interagierenden Leukozyten wird an zwei unterschiedlichen Gefäßdiametern des jeweiligen Gefäßes ermittelt und der Mittelwert bestimmt.

$$[\text{Roller - Flow}] = \text{Zellen/min}$$

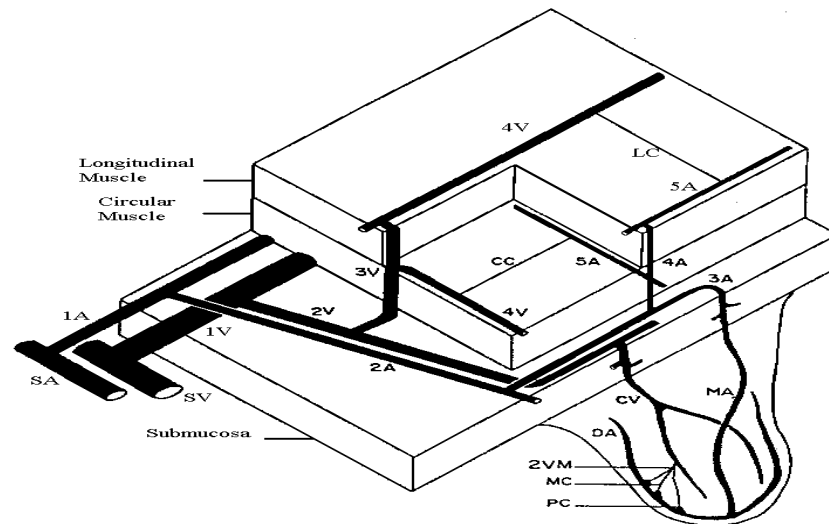


Abb. 16: Schema des Darmwandaufbaus; wesentliche Aufzweigungen der Arteriolen (A1 - A5) und Venolen (V1 - V4), Kapillaren der zirkulären (CC) und longitudinalen (LC) Muskulatur, MA: zentrale Villusarteriole mit Aufzweigung in zwei Verteilungsarteriolen (DA), PC: präkapilläre Sphinkteren, MC: Mukosakapillaren, 2VM: mukosale Venolen 2. Ordnung, CV: Villussammelvenole [103]

Adhärente Leukozyten (Sticker)

Definition: Anzahl der Leukozyten, die im Beobachtungszeitraum für mindestens 30 Sekunden an einer umschriebenen Endotheloberfläche haften. Für die Berechnung der Endotheloberfläche wird eine Zylinderstruktur des Gefäßes angenommen.

Zylinderfläche $F = l \times U$

$U = \text{Zylinderumfang} = \pi \times d$

$d = \text{Gefäßdurchmesser}$

$l = \text{Länge des Gefäßes}$

$[\text{Sticker}] = \text{Zellen} / \text{mm}^2$

Unter Zuhilfenahme eines Objektmikrometers konnte am Monitor eine maßstabsgerechte Größen- und Längenbestimmung derjenigen Gefäße vorgenommen werden, in denen Leukozyten-Endothel-Interaktionen ausgewertet wurden.

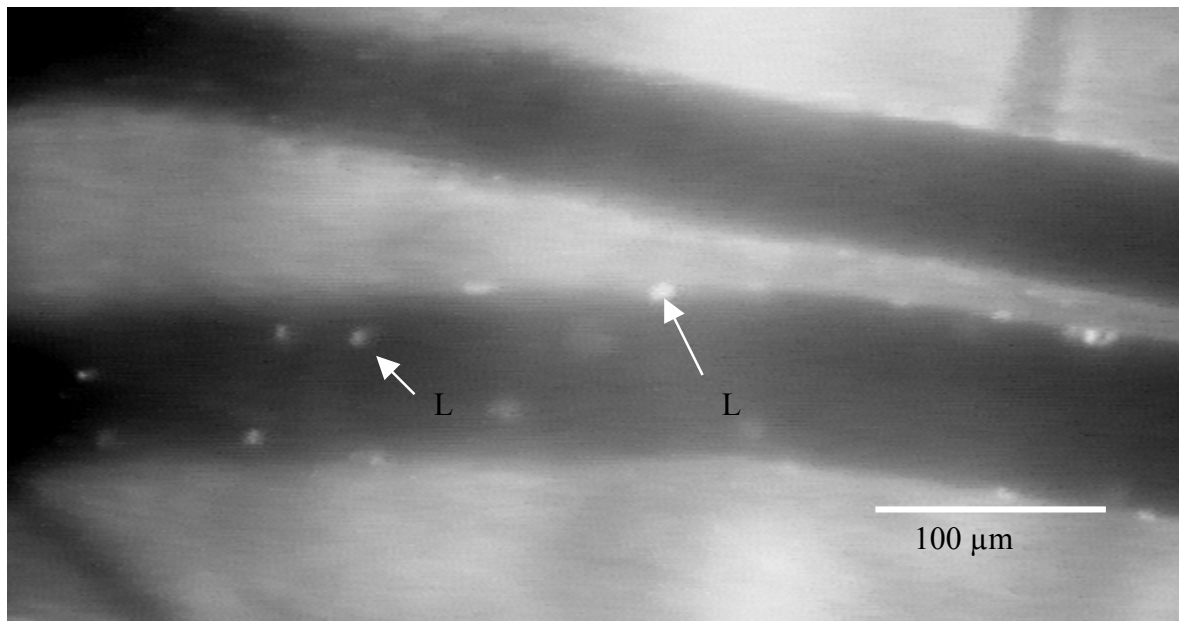


Abb. 17: Intravitalmikroskopie der Darmwand (Kontrolltier, Submukosa, obenliegend A1-Arteriole, darunter V1-Venole mit adhärierenden Leukozyten [L] markiert mit Rhodamin-6G)

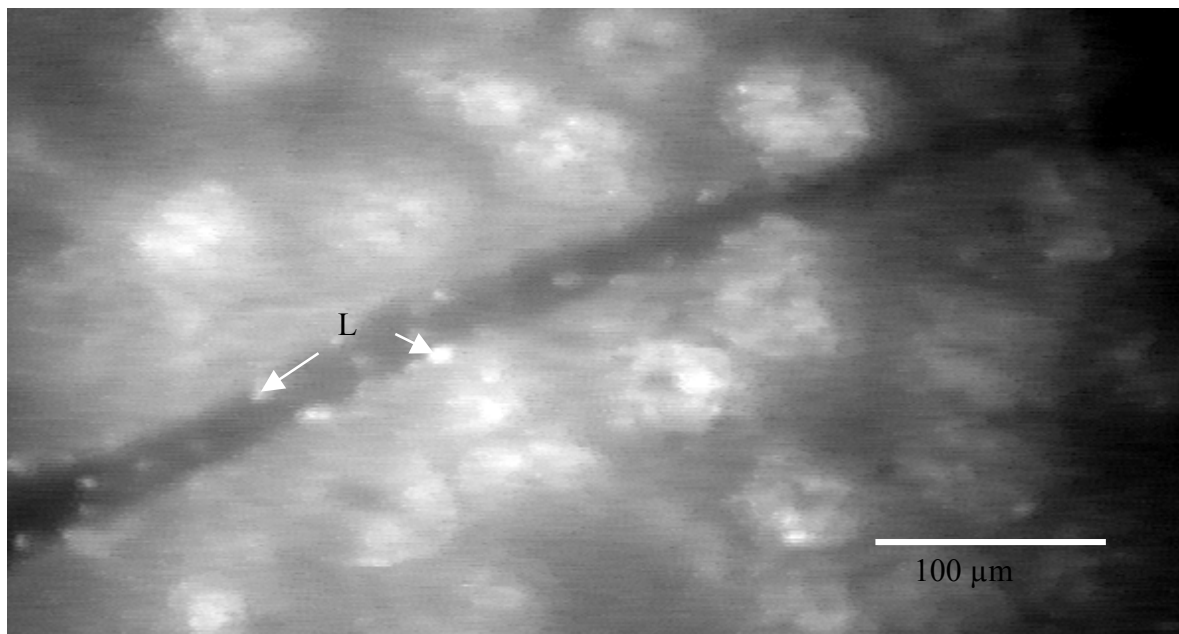


Abb. 18: Intravitalmikroskopie der Darmwand (Tier mit 5 mg/kgKG LPS, Submukosa, adhärierende Leukozyten [L] in V3-Venolen, Markierung mit Rhodamin-6G)

4.4.3 Funktionelle Kapillardichte

Definition: Die funktionelle Kapillardichte (FCD) errechnet sich aus der Länge der Kapillaren mit sichtbarer Erythrozytenperfusion (erkennbar als Hell- [FITC-Dextran-markiertes Plasma]/ Dunkel- [Erythrozyten] Kontrast) im Verhältnis zu einer umschriebenen Fläche.

Funktionslose Kapillaren: Kapillaren ohne sichtbare Erythrozytenperfusion / Kapillaren mit sichtbar stehenden Erythrozyten über eine Beobachtungszeit von mindestens 30 s

Die Auswertung erfolgte in den Schichten Lamina muscularis longitudinalis, Lamina muscularis circularis und Lamina mucosae.

Anwendung fand hierbei die im folgenden dargestellte manuelle Methode nach *Schmid-Schoenbein* et al. [253] unter Nutzung einer quadratischen Gitterschablone am Bildschirm. Sie ermöglicht die Ermittlung der FCD über die Ermittlung von Schnittpunkten perfundierter Kapillaren mit der Gitterschablone in einer "region of interest". Die FCD wird als Kapillarlänge je Gitterkästchen L_K ausgedrückt.

$$FCD (L_K) = k \times N/L$$

$L = 2 P_M d$ = Länge des Gittersystems

d = Kantenlänge der Kästchen (in μm = Originallänge)

P_M = Anzahl der Kästchen

N = Anzahl der Kreuzungen von perfundierten Kapillaren mit den Gitterlinien

k = Konstante, die durch $\pi/2$ beschrieben wird

$$[FCD] = \text{cm}/\text{cm}^2 = \text{cm}^{-1}$$

Jeweils zehn Regionen der Muskularisschichten mit einer Ausdehnung von $400 \times 500 \mu m$ sowie zehn mukosale Kapillargebiete in einer Ausdehnung von ca. $100 \times 150 \mu m$ (zentraler Villusbereich) wurden ausgewertet. Für die Kapillaren der Muskularis wurde ein Gitter der Kantenlänge von $50 \mu m$ und für die Kapillaren der Mukosa von $12,5 \mu m$ gewählt.

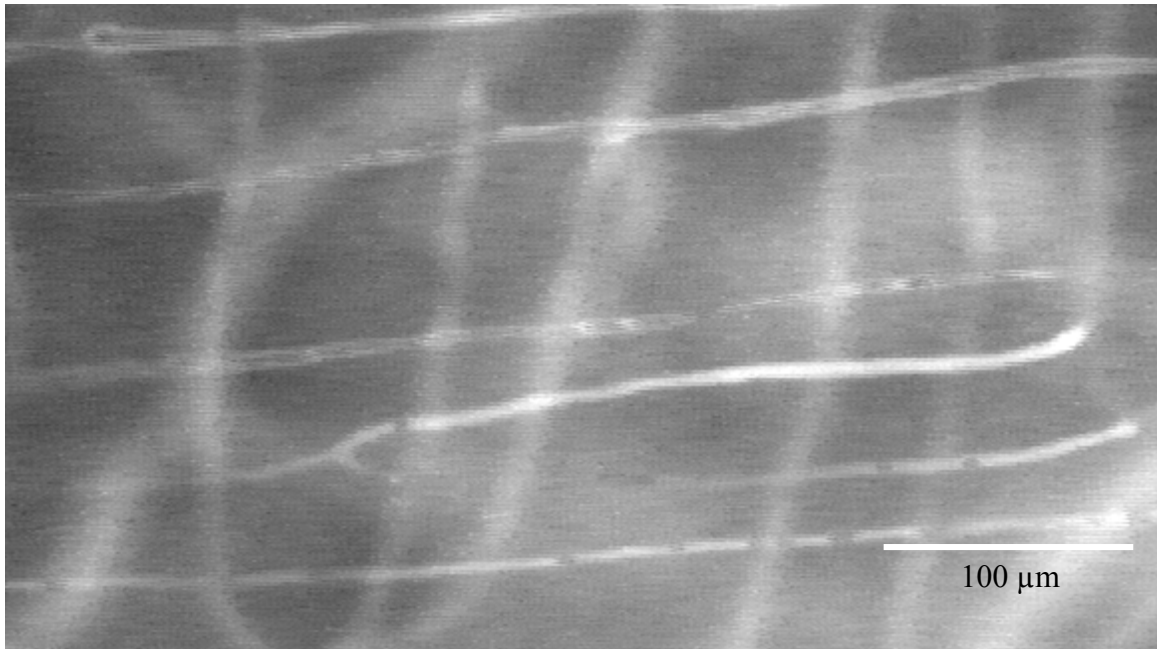


Abb. 19: Intravitalmikroskopie der Darmwand (Kontrolltier, Muscularis circ., Kontrastierung der Kapillaren mit FITC-Dextran)

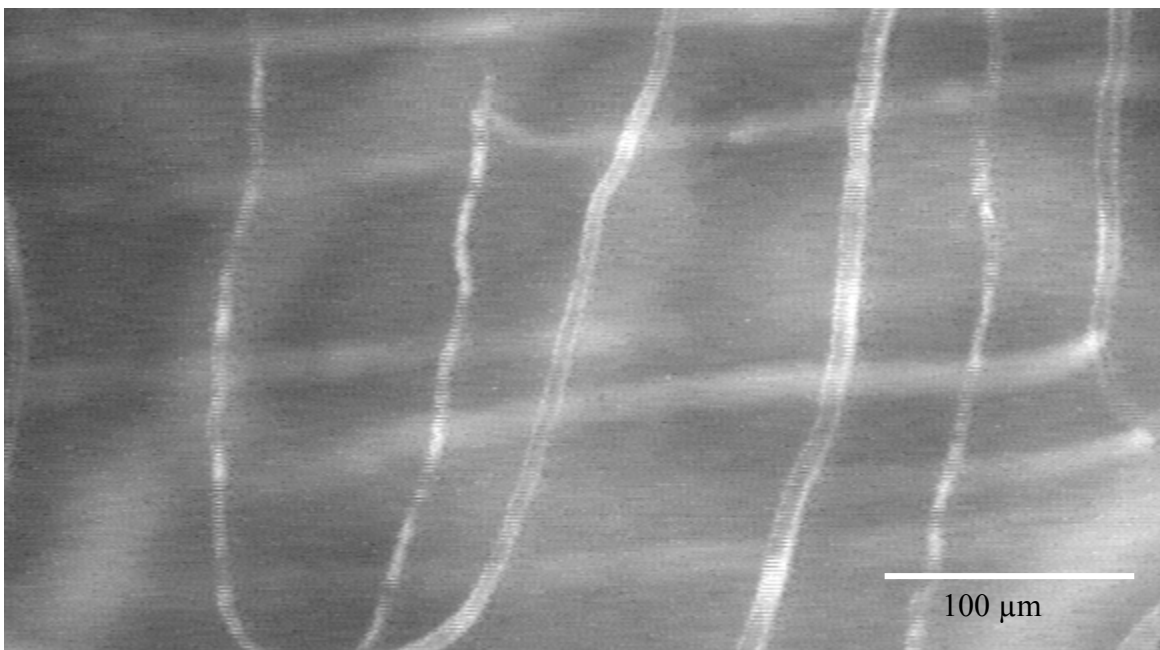


Abb. 20: Intravitalmikroskopie der Darmwand (Kontrolltier, Muscularis long., Kontrastierung der Kapillaren mit FITC-Dextran)

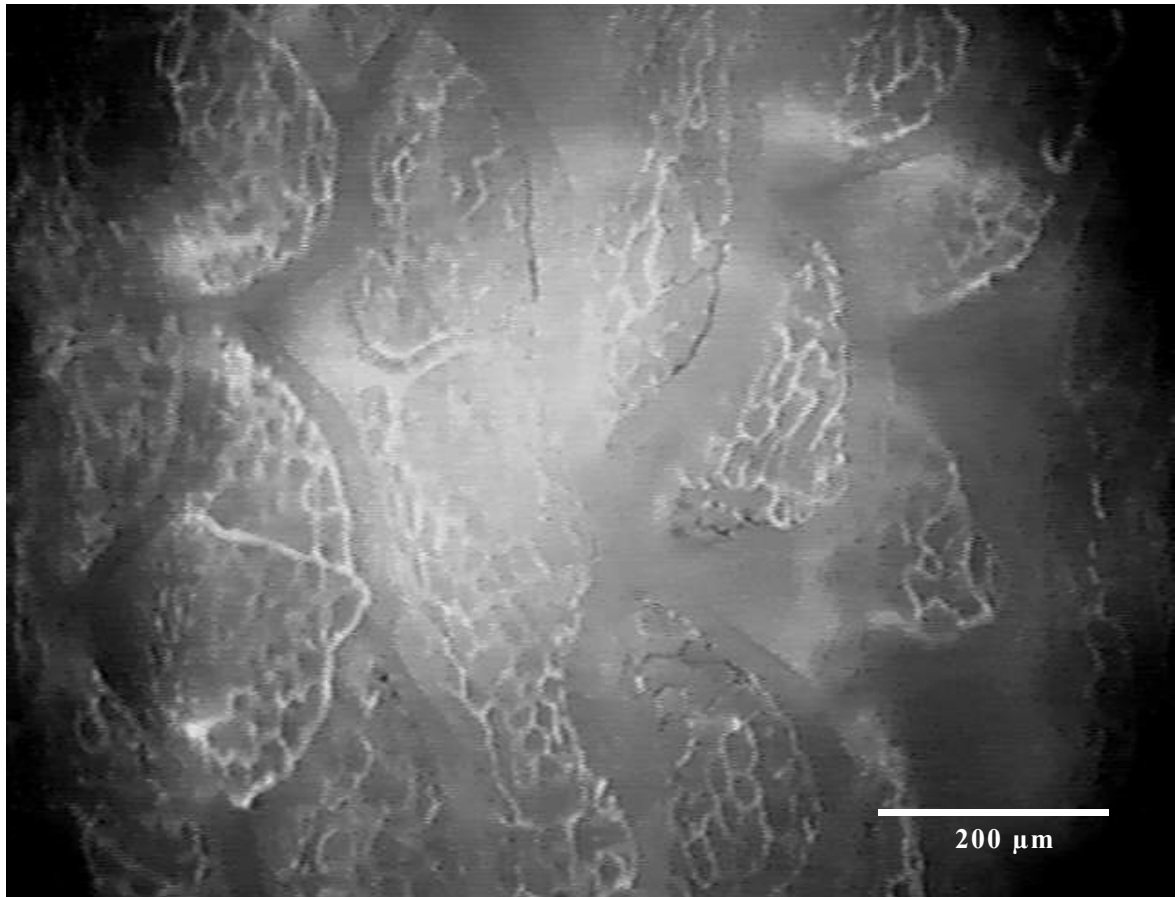


Abb. 21: Intravitalmikroskopie der Darmwand (Kontrolltier, Mukosa, Kontrastierung der Kapillaren mit FITC-Dextran)

4.5 Laser-Doppler-Flowmetrie

Die Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) wurde mit dem Gerät MBF 3D (Moore Instruments, Axminster, GB) durchgeführt. Das Gerät nutzte eine Laserdiode im nahen infraroten Frequenzbereich (810 nm; Leistung: 3 mW). Die Eichung erfolgte vor allen Messungen mit einer standardisierten Eichlösung (Lawrenz, Sulzbach, Deutschland) bei 20 °C. Über einen optischen Koppler wurde das monochromatische Laserlicht durch eine ummantelte Glasfaser (Faserdurchmesser: 0,42 mm, Manteldurchmesser: 0,7 mm; Länge: 80 cm) zum Gewebe geleitet. Der Lichtkegel hatte an der Sondenspitze einen Durchmesser von 0,42 mm. Die Restleistung des Lasers beträgt dort 1 mW. Die Sondenkonfiguration gewährleistete eine hohe Penetration des Gewebes, so dass die gesamte Darmwand erfasst wurde. Das reflektierte Licht wurde über die gleiche Glasfaser und einen Entkoppler dem Photodetektor im Gerät zugeführt. Die Messwerte wurden mit einer Abtastrate von 40 Hz über einen Zeitraum von 240 s bei einer Zeitkonstante von 0,1 s aufgezeichnet. Es wurde die Konzentration (Conc) und die mittlere Geschwindigkeit (Speed) der bewegten Teilchen (hauptsächlich Erythrozyten) im untersuchten Gebiet ermittelt [311]. Der berechnete Flux (intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss, IMBF) zeigt eine lineare Korrelation zum totalen intestinalen Blutfluss [143]. Die Daten wurden über eine RS 232-Schnittstelle online auf einen IBM-kompatiblen PC (ESCOM, Heppenheim, Deutschland) übertragen und der weiteren Auswertung (Powerspektralanalyse) zugeführt.

4.6 Powerspektralanalyse

Die Software für die Powerspektralanalyse (PSA) von Blutdruck und Laser-Doppler-Flowmetrie wurde von *Stauss* et al. [280] entwickelt und freundlicherweise für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt.

Die Daten der IMBF-Messungen wurden für die Analyse in das ASCII-Format überführt. Bei einer Abtastrate von 40 Hz und 240 Sekunden Aufzeichnungslänge resultierten 9600 Messwerte. Zur Überprüfung auf Kontinuität und zur Identifizierung von Artefakten wurden die Primärdaten visuell kontrolliert. Die Artefakte wurden aus den

Sequenzen eliminiert. Bei einer Unterschreitung der kritischen Aufzeichnungslänge von 210 Sekunden wurden die Datensätze verworfen.

Nach der visuellen Inspektion der Daten erfolgte zunächst die Entfernung von linearen Trends (Hochpassfilter; 50 mHz) und eine Bandbegrenzung der Zeitreihen (Tiefpassfilter; 3 Hz). Diese bandbegrenzten Daten wurden dann mit 6 Hz erneut abgetastet.

Die Spektren wurden mit der Methode der Autoregressionsanalyse berechnet [222; 224; 281]. Die quantitative Auswertung der Powerspektren erfolgte im Frequenzbereich von 0 bis 3 Hz. Dazu wurden in Anlehnung an *Julien* et al. [148] die Flächen unter der Kurve des Powerspektrums in den Frequenzbereichen 0,27 – 0,74 Hz (low frequency; LF) und 0,76 – 3 Hz (high frequency; HF) ermittelt (siehe Abbildung 22).

Die Flächen unter der Kurve zum Zeitpunkt 0 h wurden als 100 % angesetzt. Die Flächen unter der Kurve zu den folgenden Zeitpunkten wurden auf den Zeitpunkt 0 h bezogen, so dass z.B. ein Anstieg der spektralen Leistungsdichte auf das Doppelte als 200 % angegeben wird.

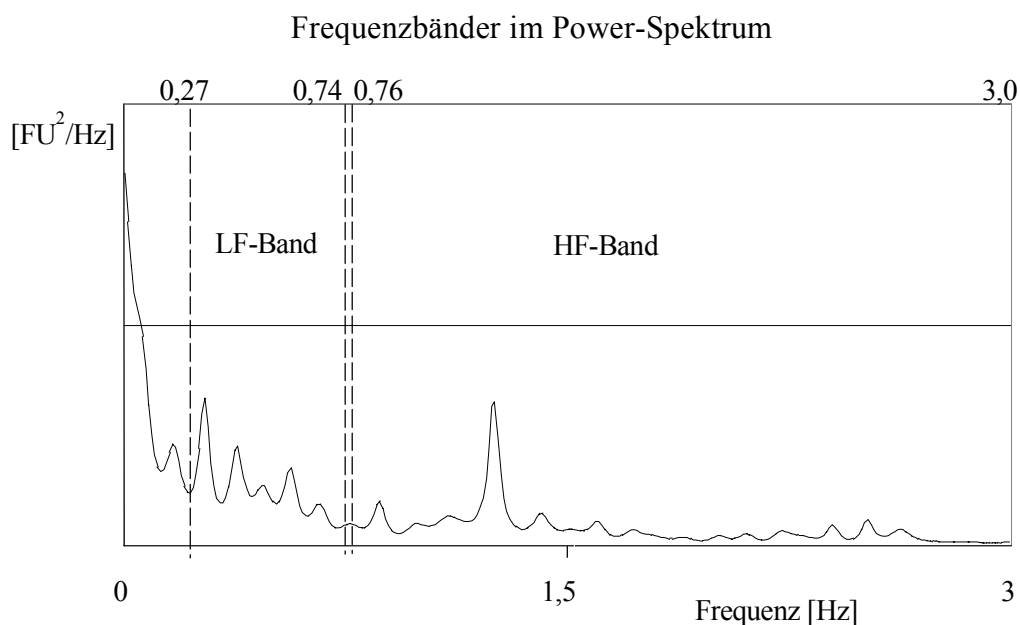


Abb. 22: Ausgewertete Frequenzbänder im IMBF-Powerspektrum der Ratte (FU = flux units)

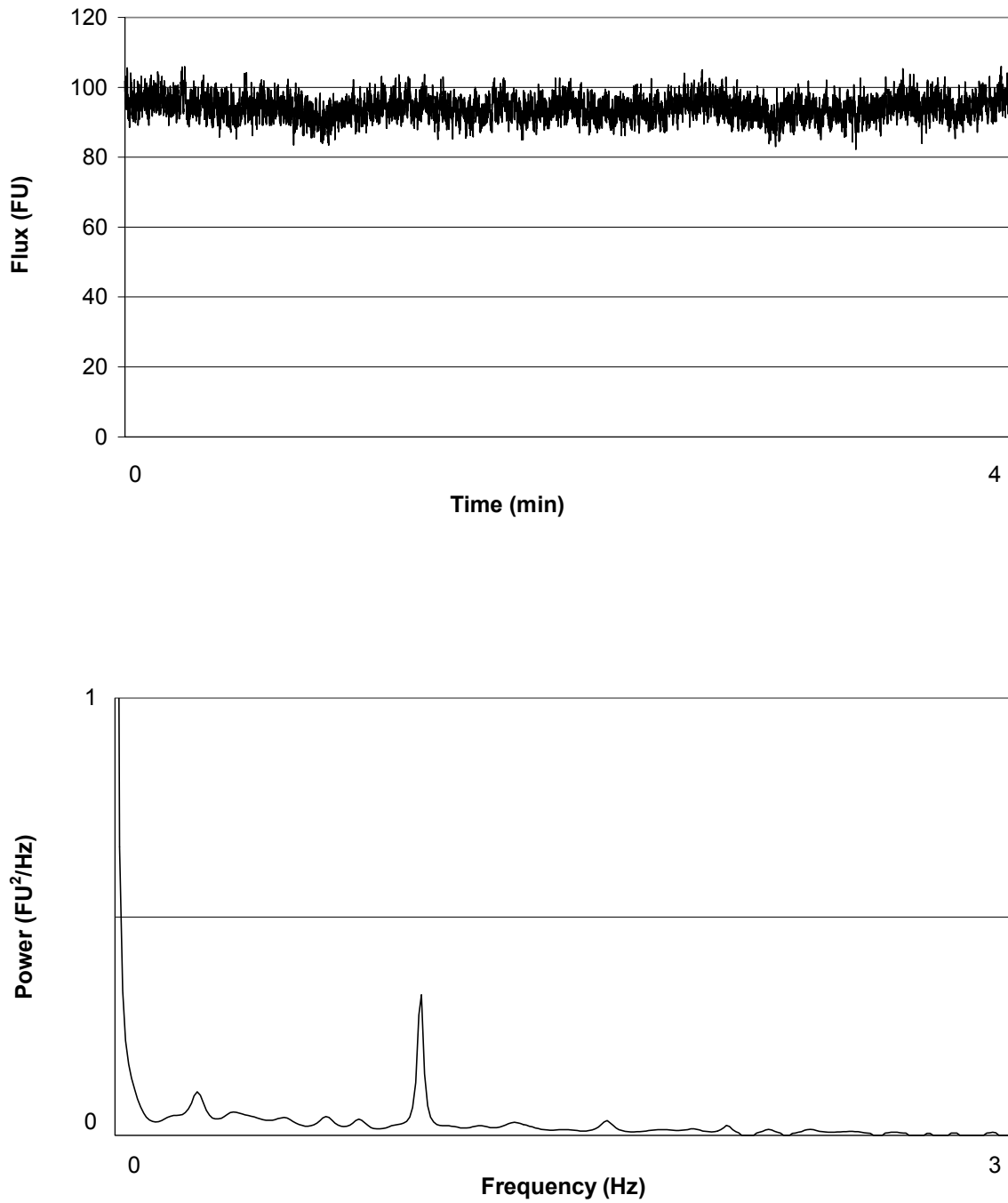


Abb. 23: IMBF - Originalaufzeichnung und Powerspektrum, Normalbefund (FU = flux units)

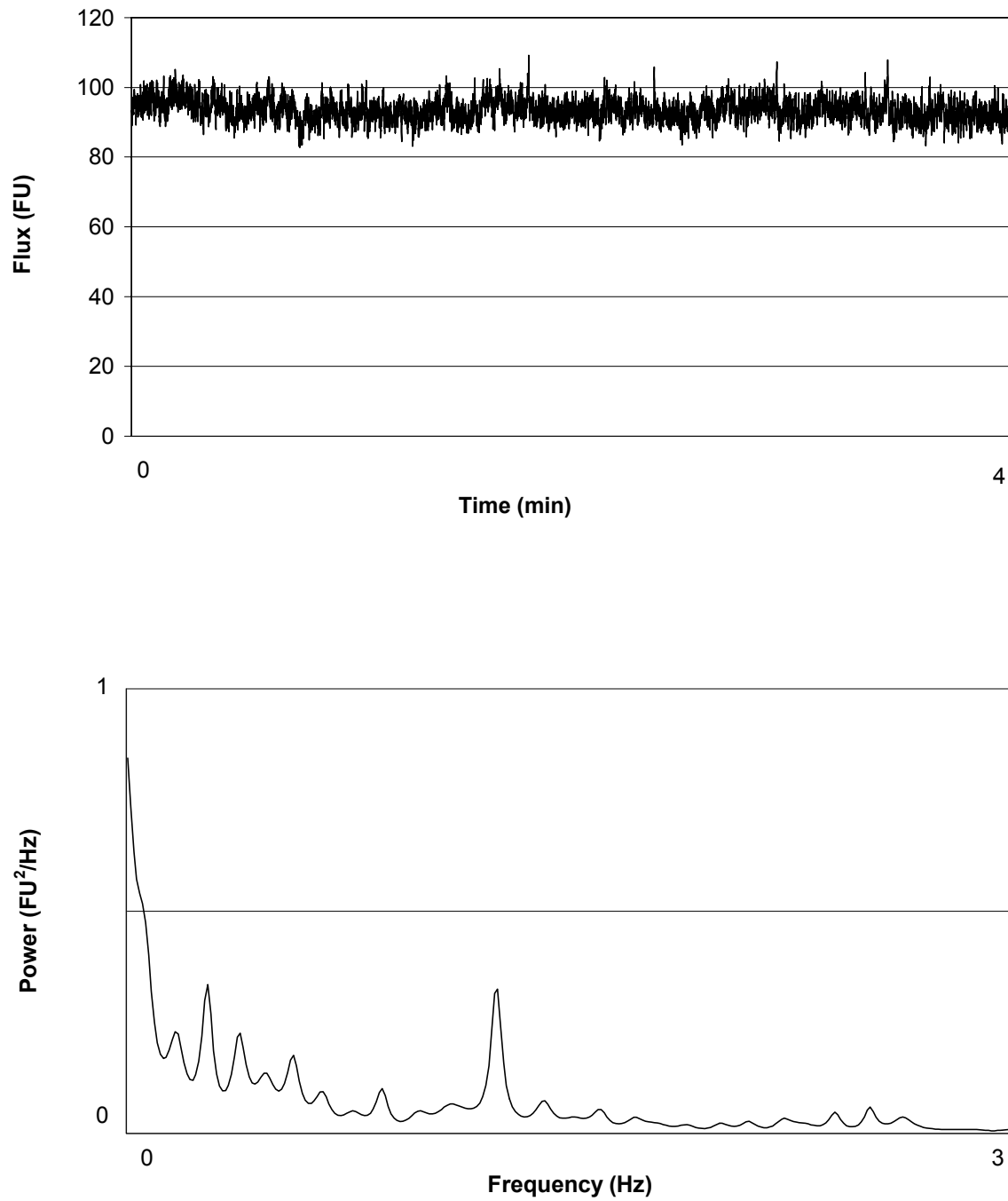


Abb. 24: IMBF - Originalaufzeichnung und Powerspektrum, Endotoxinämie (FU = flux units)

4.7 Statistik

Für die statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse wurden die Statistikpakete SigmaStat/SigmaPlot und SPSS (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) benutzt. Zunächst wurde eine deskriptive Statistik erstellt (Mittelwert, Varianz, Standardabweichung, Standardfehler). Die Testung auf Normalverteilung erfolgte nach *Kolmogorov-Smirnov*.

Lag eine Normalverteilung vor, erfolgte der einfaktorielle Mittelwertvergleich unabhängiger Stichproben (1 Variable, mehrere Gruppen) mittels Ein-Weg-Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA). Bei Auftreten von Signifikanz erfolgte die *post hoc*-Testung mit einem nach *Bonferroni* korrigierten *t*-Test.

Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde eine nichtparametrische Varianzanalyse (*Kruskal-Wallis*) mit nachfolgendem nach *Bonferroni* korrigiertem *Wilcoxon*-Test vorgenommen.

Bei mehrfaktoriellem Design (wiederholte Messungen, mehrere Gruppen) führten wir eine Zwei-Weg-Varianzanalyse mit Messwertwiederholung (two-way repeated measures-ANOVA) mit anschließendem *Scheffé*-Test durch.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0.05$ angesetzt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Teil 1 – antioxidative Substanzen

5.1.1 Klinische Parameter

5.1.1.1 Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Herzfrequenz (Hf, Abb. 27) - Ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum Ausgangswert war bei allen Gruppen, die Endotoxin erhalten hatten, eine Stunde nach Endotoxin-Applikation zu verzeichnen ($p < 0.05$).

In der Oxypurinol-Gruppe war dieser Anstieg bereits nach 30 Minuten signifikant. Im weiteren Verlauf wurden in dieser Gruppe die höchsten Hf-Werte gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den LPS-belasteten Gruppen fanden wir nicht. In allen Gruppen persistierte das erhöhte Hf-Niveau bis zum Versuchsende.

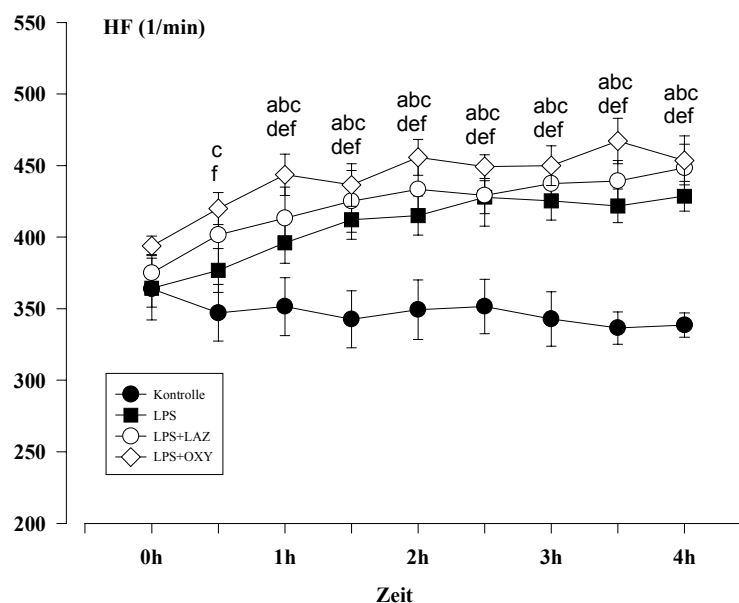


Abb. 25: 5 mg/kg KG LPS – Herzfrequenz (HF); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY; ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS+LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP, Abb. 28) – Bei allen Tieren mit LPS-Belastung beobachteten wir einen signifikanten Blutdruckabfall innerhalb von 30 Minuten nach Versuchsbeginn ($p < 0.05$). Signifikanz bestand sowohl im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten als auch zum Vergleichswert in der Kontrollgruppe. Der MAP sank jedoch in der Regel nicht unter 80 mmHg ab.

Zum Zeitpunkt 1 h hatte sich der Blutdruck in den therapierten Gruppen wieder stabilisiert. In der unbehandelten LPS-Gruppe wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Werte gemessen, die Differenz war zu diesem und zu den späteren Zeitpunkten jedoch nicht signifikant.

Zwischen den Tieren der Behandlungsgruppen und denen der Kontrollgruppe bestanden im weiteren Verlauf statistisch keine Unterschiede im MAP. Insgesamt kam es über den Beobachtungszeitraum von 4 h auch in der Kontrollgruppe zu einem tendenziellen, statistisch jedoch nicht signifikanten, leichten Blutdruckabfall.

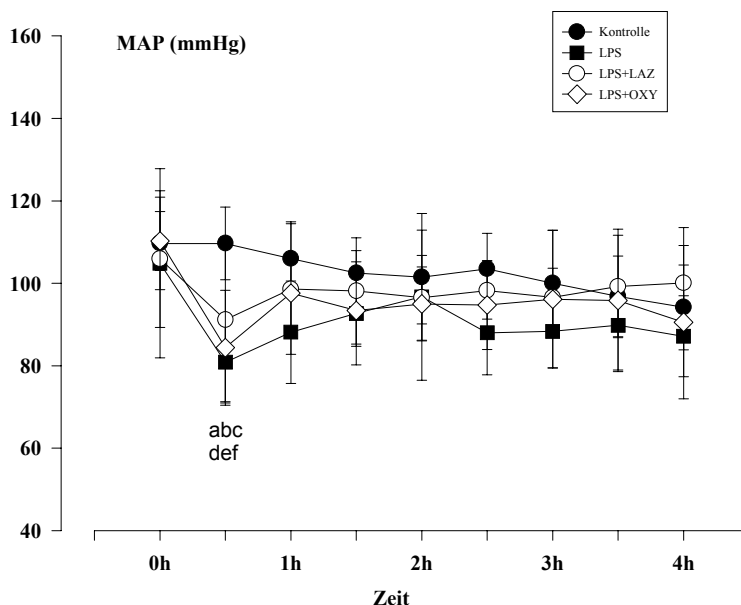


Abb. 26: 5 mg/kg KG LPS - Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY; ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS+LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Herzfrequenz (Abb. 29) – Den raschesten Anstieg der Herzfrequenz in der Endotoxinämie zeigte erneut die Oxypurinol-Gruppe ($p < 0.05$ nach 0,5 h). 2 h nach LPS-Gabe beobachteten wir auch in den anderen LPS-belasteten Gruppen einen signifikanten Herzfrequenzanstieg, der bis zum Versuchsende persistierte ($p < 0.05$). Die höchsten Werte wurden jetzt in der Lazaroid-Gruppe gemessen ($p < 0.05$ vs. Lazaroid- und unbehandelte LPS-Gruppe nach 4 h).

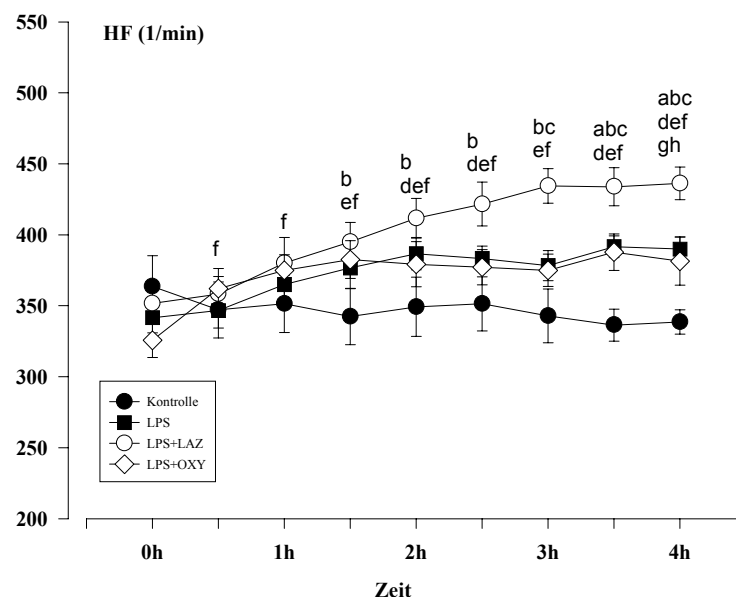


Abb. 27: 20 mg/kg LPS – Herzfrequenz (HF); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY; ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS+LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h, ^g $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS+OXY, ^h $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS

Mittlerer arterieller Blutdruck (Abb. 30) – Der Blutdruckabfall nach Applikation von 20 mg/kg KG LPS war in der unbehandelten LPS-Gruppe stärker ausgeprägt als bei Gabe von 5 mg/kg KG LPS. Es wurden durchschnittlich Werte um 70 mmHg gemessen ($p < 0.05$ vs. Ausgangswert und vs. Kontroll-Gruppe).

Auch die anderen Gruppen, die LPS erhalten hatten, zeigten wiederum einen initialen Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks. In der unbehandelten LPS-Gruppe blieb die MAP-Reduktion im Vergleich zum Ausgangswert über den gesamten Versuchszeitraum signifikant (Werte um 80 mmHg; $p < 0.05$).

Tiere, die mit dem Lazaroid U-74389G behandelt worden waren, wiesen nach zwei Stunden im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erniedrigte Blutdruckwerte auf. In der mit Oxypurinol behandelten Gruppe war dies erst am Versuchsende nach vier Stunden der Fall. Verglichen mit der Kontrollgruppe, die den beschriebenen diskreten Blutdruckrückgang während des Versuches aufwies, waren die LPS-Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

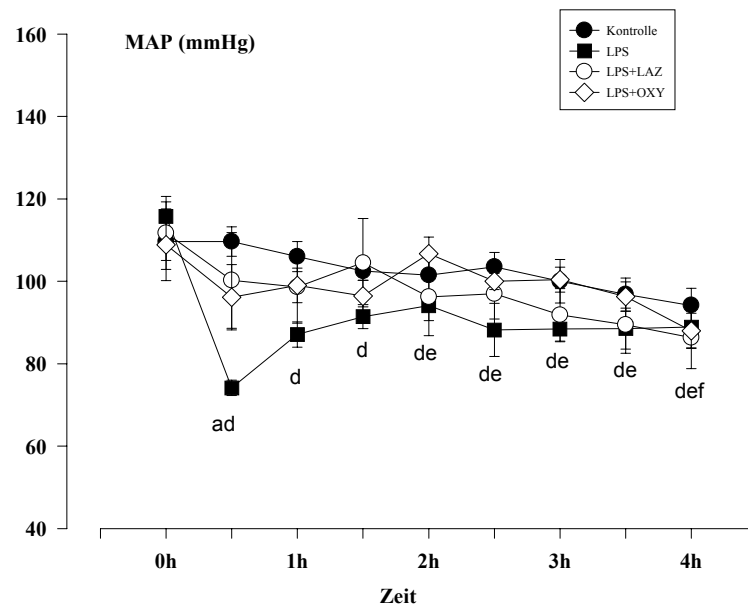


Abb. 28: 20 mg/kg KG LPS - Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS+LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h

5.1.1.2 Sauerstoffpartialdruck, Kohlendioxidpartialdruck, pH-Wert

Versuchsreihen mit 5 bzw. 20 mg/kg KG LPS

Sauerstoffpartialdruck (pO₂, Tabellen 3,4) – In beiden Versuchsreihen fanden wir bei den tracheotomierten und spontan atmenden Tieren über den Beobachtungszeitraum einen signifikanten Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes im arteriellen Blut (p<0.05 nach vier Stunden). In den unbehandelten LPS-Gruppen fehlte dieser Anstieg jedoch.

In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS sahen wir einen signifikant niedrigeren pO₂ dieser Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen vier Stunden nach Induktion der Endotoxinämie.

Tabelle 3: 5 mg/kg KG LPS - Sauerstoffpartialdruck (pO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20;

^a p<0.05 vs. Ausgangswert; ^b p<0.05 vs. LPS-Gruppe

pO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	10,75 ± 1,08	11,48 ± 3,46	14,06 ± 1,51 ^{a,b}
LPS	12,10 ± 3,41	12,31 ± 2,83	9,84 ± 1,32
LPS+LAZ	12,29 ± 2,88	13,59 ± 1,21	14,12 ± 3,51 ^{a,b}
LPS+OXY	10,63 ± 0,71	13,74 ± 2,06 ^a	14,47 ± 0,84 ^{a,b}

Tabelle 4: 20 mg/kg KG LPS - Sauerstoffpartialdruck (pO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20;

^a p<0.05 vs. Ausgangswert

pO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	10,75 ± 1,08	11,48 ± 3,46	14,06 ± 1,51 ^a
LPS	9,85 ± 3,93	10,90 ± 1,52	11,83 ± 3,57
LPS+LAZ	9,12 ± 0,99	10,03 ± 1,69	11,56 ± 2,89 ^a
LPS+OXY	8,92 ± 2,08	12,05 ± 1,48	13,51 ± 3,28 ^a

Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂, Tabellen 5,6) - Ein Trend zur Hypokapnie zeichnete sich in allen Versuchsgruppen einschließlich der Kontroll-Gruppe zu den Zeitpunkten 2 h und 4 h ab. In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS war ein signifikanter pCO₂-Abfall gegenüber den Ausgangswerten zum Zeitpunkt 4 h in der Oxypurinol-Gruppe und der Kontroll-Gruppe gegeben (p<0.05). Zwischen den Versuchsgruppen existierten keine Unterschiede.

In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG fanden wir in allen Endotoxinämie-Gruppen bereits nach zwei Stunden einen signifikanten pCO₂-Abfall infolge einer ausgeprägten Hyperventilation (p<0.05).

Tabelle 5: 5 mg/kg KG LPS - Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20; ^a p<0.05 vs. Ausgangswert

pCO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	5,27 ± 0,43	4,55 ± 0,39	3,85 ± 0,67 ^a
LPS	4,62 ± 1,06	3,61 ± 0,97	4,03 ± 0,63
LPS+LAZ	4,52 ± 0,82	3,81 ± 0,5	3,44 ± 1,03
LPS+OXY	4,40 ± 0,17	3,47 ± 0,82	3,09 ± 0,92 ^a

Tabelle 6: 20 mg/kg KG LPS - Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20; ^a p<0.05 vs. Ausgangswert

pCO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	5,27 ± 0,43	4,55 ± 0,39	3,85 ± 0,67 ^a
LPS	5,80 ± 1,36	3,97 ± 0,28 ^a	3,03 ± 0,64 ^a
LPS+LAZ	5,93 ± 0,58	3,85 ± 0,80 ^a	3,87 ± 0,61 ^a
LPS+OXY	6,18 ± 0,78	4,11 ± 0,45 ^a	3,60 ± 1,39 ^a

pH-Wert - Die pH-Werte zeigten keine wesentlichen Veränderungen innerhalb der einzelnen Gruppen und keine Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der Messzeitpunkte. Es zeichnete sich lediglich ein leichter Trend zu alkalischeren Werten während des Beobachtungszeitraumes ab ($p < 0.05$ in der Kontroll-Gruppe nach vier Stunden).

Bei Gabe von 20 mg/kg KG LPS und Behandlung mit Oxypurinol fanden wir nach zwei und vier Stunden eine signifikante Zunahme des pH-Wertes auf maximal $7,49 \pm 0,05$.

Tabelle 7: 5 mg/kg KG LPS - pH-Wert; Mittelwert \pm SD; n = 20; ^a $p < 0.05$ vs. Ausgangswert

pH	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	$7,42 \pm 0,01$	$7,44 \pm 0,02$	$7,49 \pm 0,06^a$
LPS	$7,44 \pm 0,03$	$7,47 \pm 0,03$	$7,47 \pm 0,06$
LPS+LAZ	$7,43 \pm 0,03$	$7,46 \pm 0,02$	$7,48 \pm 0,08$
LPS+OXY	$7,44 \pm 0,02$	$7,49 \pm 0,04$	$7,47 \pm 0,06$

Tabelle 8: 20 mg/kg KG LPS - pH-Wert; Mittelwert \pm SD; n = 20; ^a $p < 0.05$ vs. Ausgangswert, ^b $p < 0.05$ vs. 2h-Wert derselben Gruppe

pH	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	$7,42 \pm 0,01$	$7,44 \pm 0,02$	$7,49 \pm 0,06^a$
LPS	$7,43 \pm 0,07$	$7,49 \pm 0,05$	$7,41 \pm 0,12$
LPS+LAZ	$7,40 \pm 0,05$	$7,49 \pm 0,06$	$7,39 \pm 0,12$
LPS+OXY	$7,41 \pm 0,03$	$7,49 \pm 0,05^a$	$7,45 \pm 0,10^b$

5.1.1.3 Laktat

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Der Laktatspiegel der Kontrollgruppe blieb stabil. In der unbehandelten LPS-Gruppe und der Oxypurinol-Gruppe registrierten wir 2 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant gegenüber der Baseline erhöhte Laktatwerte ($p < 0.05$). In der Lazaroid-Gruppe sahen wir zu diesem Zeitpunkt keine erhöhten Werte.

4 Stunden nach LPS-Applikation lagen die Laktat-Werte in allen Endotoxin-Gruppen signifikant über dem Ausgangswert sowie über dem Kontrollwert zum gleichen Zeitpunkt. Die Werte in der unbehandelten LPS-Gruppe und in der Oxypurinolgruppe waren dabei signifikant höher als in der Lazaroid-Gruppe.

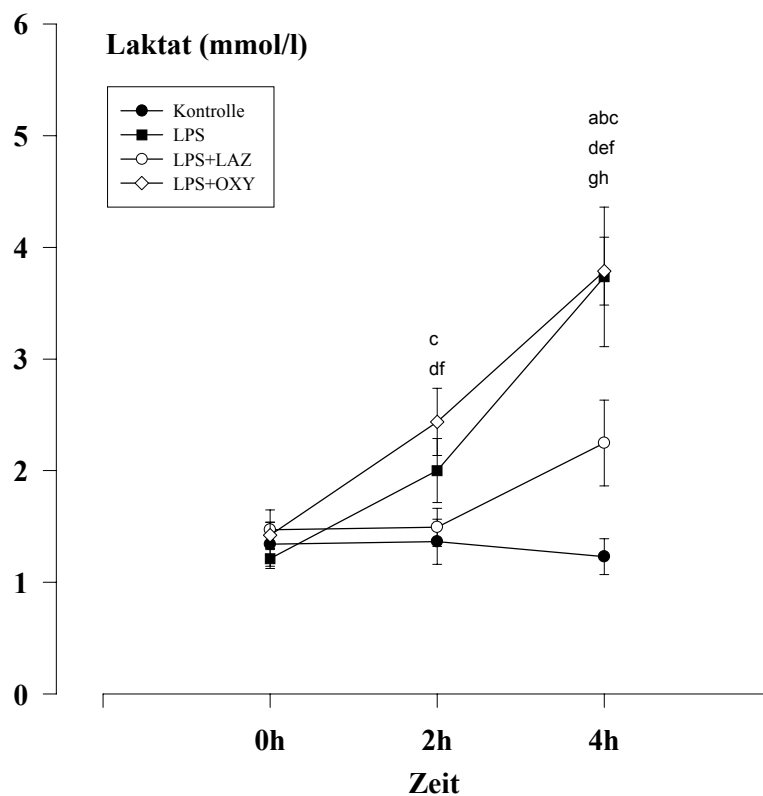


Abb. 29: 5 mg/kg KG LPS - Laktat; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS-LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h, ^g $p < 0.05$ LPS-LAZ vs. LPS, ^h $p < 0.05$ LPS-LAZ vs. LPS-OXY

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS kam es in den betreffenden Gruppen bereits nach zwei Stunden zum signifikanten Laktatanstieg ($p < 0.05$). Bei der erhöhten Endotoxinbelastung blieb dieser Effekt auch in der Lazaroid-Gruppe nicht aus. Der Laktatanstieg in den Endotoxinämie-Gruppen war nach vier Stunden ebenfalls signifikant gegenüber den Ausgangswerten und der Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt ($p < 0.05$).

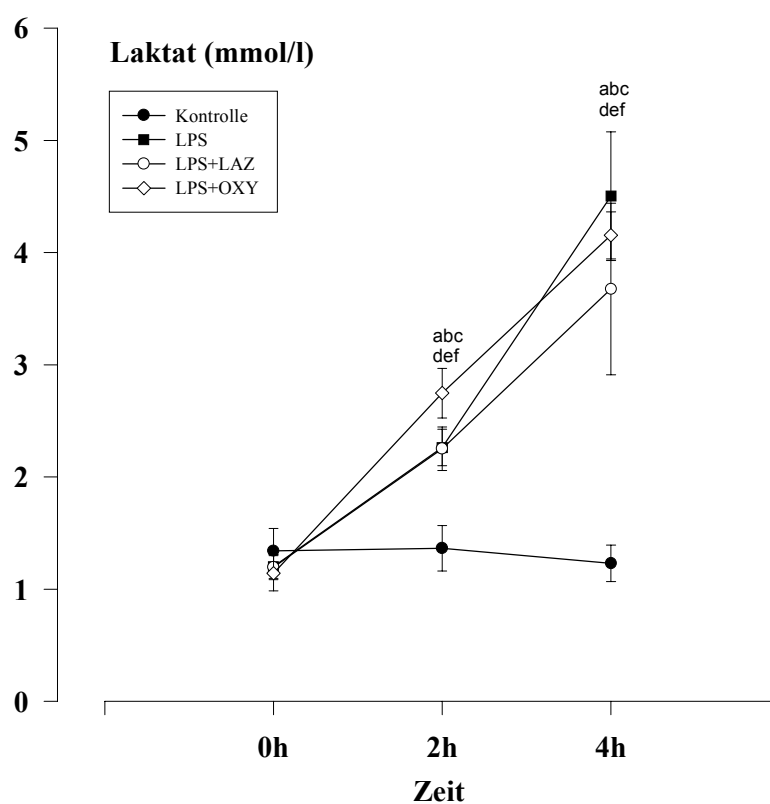


Abb. 30: 20 mg/kg KG LPS - Laktat; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS-LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h

5.1.1.4 Leukozyten

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Nach Induktion der Endotoxinämie kam es in den betreffenden Versuchsgruppen im Vergleich zu den Ausgangswerten zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut. Der Rückgang trat bereits nach zwei Stunden auf und hielt über den Beobachtungszeitraum an. Die Reduktion war am deutlichsten (35 % vom Ausgangswert) in der unbehandelten LPS-Gruppe und in der Oxypurinol-Gruppe ($p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe).

Bei den Tieren, die mit dem Lazaroid U-74389G behandelt worden waren, war die Leukopenie weniger stark ausgeprägt (50 % vom Ausgangswert). Ein signifikanter Unterschied der Lazaroid-Gruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen bestand jedoch nicht.

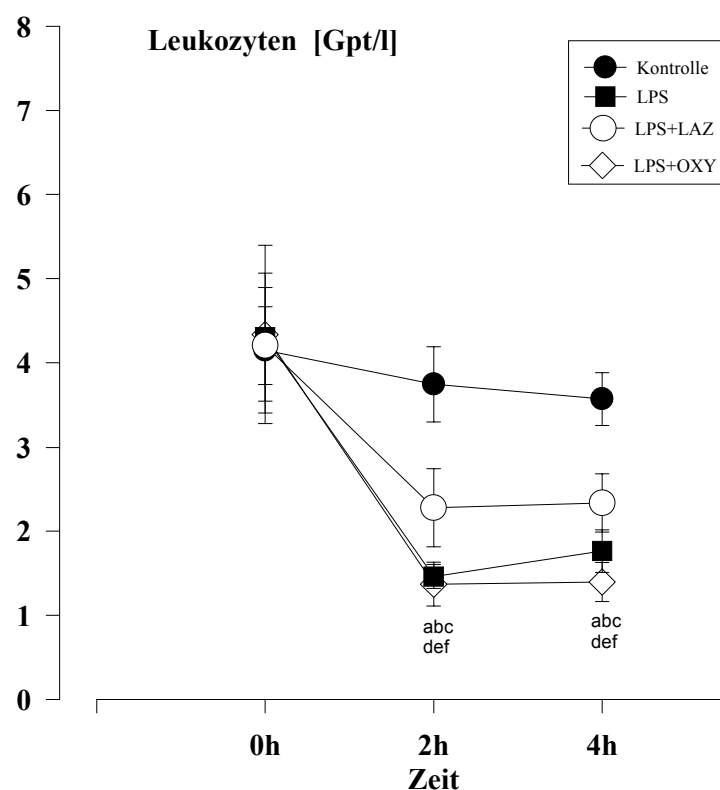


Abb. 31: 5 mg/kg KG LPS – Leukozytenzahl; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS-LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Die Endotoxin-induzierte Leukopenie war nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS ebenso stark ausgeprägt wie in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. Hier kam es nach zwei Stunden gleichfalls zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahlen in allen Gruppen, die LPS erhalten hatten ($p < 0.05$ vs. Ausgangs- und Kontrollwert). Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen wurde nicht verzeichnet. Die Leukozytenzahl betrug nach vier Stunden Endotoxinämie $1,2 \pm 0,2$ Gpt/l (28 % vom Ausgangswert; $p < 0.05$). In der Kontroll-Gruppe kam es nur zu einem milden Rückgang der Leukozytenzahlen um 14 % ($4,2 \pm 0,8$ vs. $3,6 \pm 0,3$ Gpt/l).

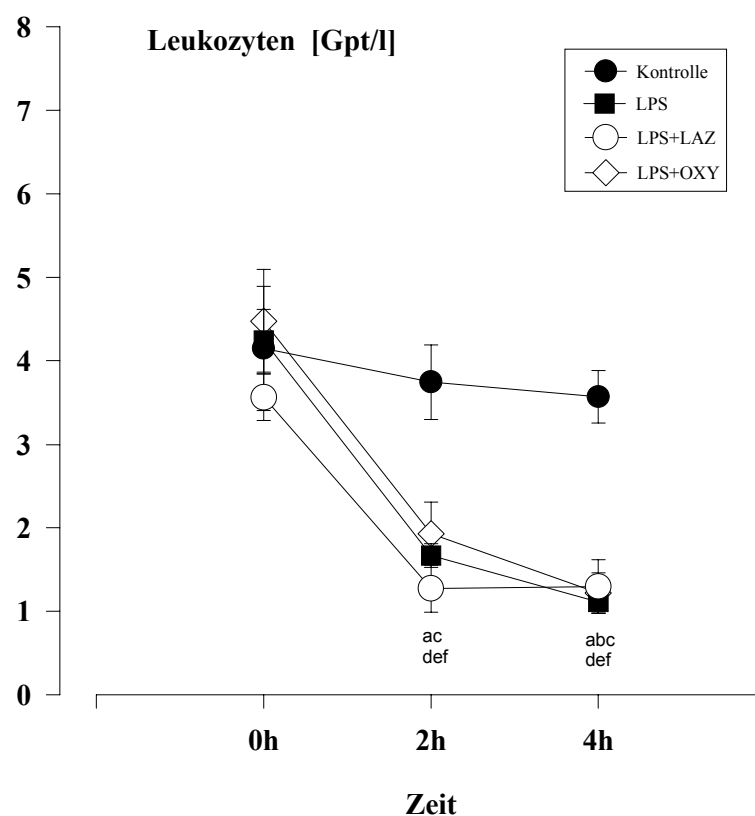


Abb. 32: 20 mg/kg KG LPS – Leukozytenzahl; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+LAZ, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+OXY, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+LAZ vs. LPS-LAZ 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+OXY vs. LPS+OXY 0h

5.1.2 Intravitalmikroskopie

5.1.2.1 Roller-Flow

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Unter Endotoxinämie kam es zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl temporär mit dem Gefäßendothel interagierender Leukozyten pro Zeiteinheit (Roller-Flow; $p < 0,05$). Der Roller-Flow in den V1-Venolen betrug 31% und in den V3-Venolen 15 % des Vergleichswertes der Kontrollgruppe. Bei Behandlung mit dem Lazaroid U-74389G wurde dies nicht beobachtet. In den größeren V1-Venolen entsprach der Roller-Flow dem der Kontrollgruppe (54 ± 11 vs. 50 ± 6 n/min). In den kleineren V3-Venolen war der Roller-Flow der Lazaroid-behandelten Tiere zwar gegenüber der Kontrollgruppe vermindert (22 ± 4 vs. 61 ± 5 n/min; $p < 0,05$), die Werte der mit Oxypurinol therapierten- bzw. unbehandelten Tiere lagen jedoch noch niedriger (12 ± 2 bzw. 9 ± 2 n/min; $p < 0,05$ vs. Lazaroidgruppe). Die Oxypurinol-Gabe führte auch in den V1-Venolen zu keiner Beeinflussung der Anzahl rollender Leukozyten.

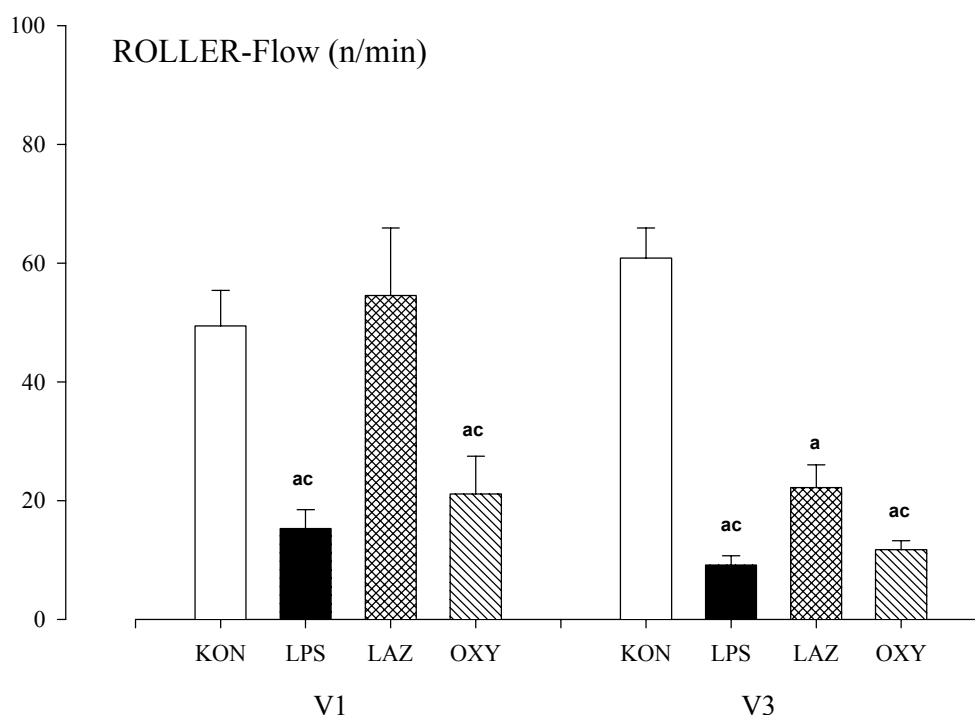


Abb. 33: 5 mg/kg KG LPS – Roller-Flow in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je $n = 20$); ^a $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, ^c $p < 0,05$ vs. Lazaroid-Gruppe

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Bei erhöhter Endotoxinbelastung mit 20 mg/kg KG LPS kam es zu einer weiteren Reduktion der Anzahl der nur temporär mit dem Gefäßendothel interagierender Leukozyten pro Zeiteinheit (Abb. 36). In der unbehandelten LPS-Gruppe lag der Roller-Flow in den V1-Venolen bei 23 % (11 ± 1 n/min) und in den V3-Venolen bei 12 % (8 ± 1 n/min) des Vergleichswertes der Kontrollgruppe (V1: 50 ± 6 n/min; V3: 61 ± 5 ; $p < 0.05$). In den beiden Behandlungsgruppen war der Roller-Flow in den untersuchten Gefäßpopulationen nach zwei Stunden Endotoxinämie ebenfalls signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt (V1: LAZ 15 ± 2 n/min, OXY: 13 ± 1 n/min; V3: LAZ 8 ± 1 n/min, OXY 8 ± 1 n/min; $p < 0.05$). Zwischen den drei Endotoxin-belasteten Gruppen gab es weder in den V1- noch in den V3-Venolen signifikante Unterschiede.

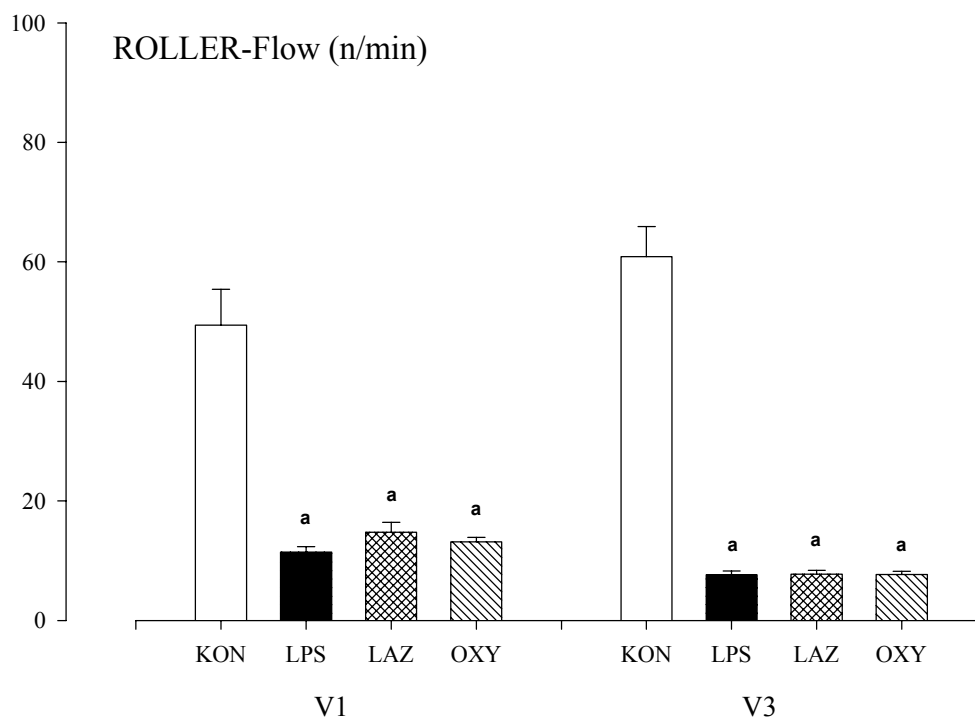


Abb. 34: 20 mg/kg KG LPS – Roller-Flow in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je $n = 20$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe

5.1.2.2 Sticker

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Bei der unbehandelten LPS-Gruppe kam es sowohl in den V1- als auch in den V3-Venolen zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl dauerhaft am Gefäßendothel adhärenter Leukozyten (Sticker; $p < 0.05$). In beiden Gefäßpopulationen vervierfachte sich dieser Wert (V1-Venolen: 238 ± 42 vs. 62 ± 10 n/mm^2 in der Kontrollgruppe; V3-Venolen: 399 ± 33 vs. 96 ± 14 n/mm^2 in der Kontrollgruppe). Bei Behandlung mit dem Lazaroid U-74389G bzw. Oxypurinol wurde in den V1-Venolen eine signifikante Reduktion der Anzahl fest adhärenter Leukozyten erzielt ($p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe). In der Lazaroid-Gruppe betrug der Wert 125 ± 6 n/mm^2 (- 48 %), in der Oxypurinol-Gruppe 182 ± 39 n/mm^2 (- 24 %). In den V3-Venolen war das Sticking insgesamt stärker ausgeprägt. Signifikante Unterschiede zwischen den Endotoxin-belasteten Gruppen fanden sich nicht.

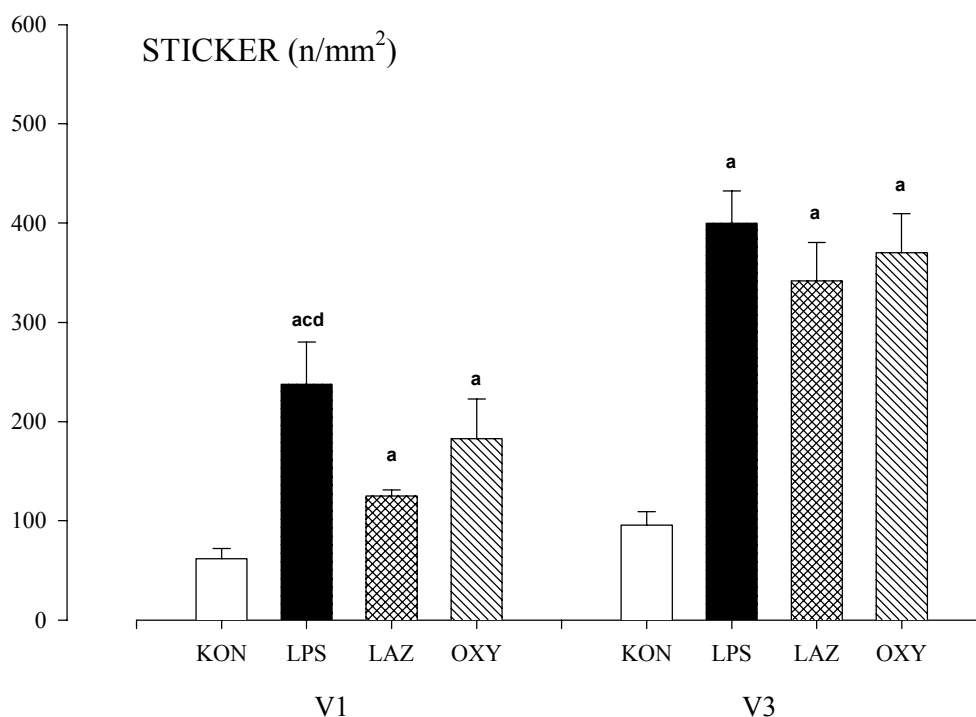


Abb. 35: 5 mg/kg KG LPS – Anzahl stickender Leukozyten in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je $n = 20$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^c $p < 0.05$ vs. Lazaroid-Gruppe, ^d $p < 0.05$ vs. Oxypurinol-Gruppe

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Bei Erhöhung der Endotoxin-Dosis beobachteten wir eine weitere Zunahme der Anzahl dauerhaft adhärenter Leukozyten am Gefäßendothel. Im Vergleich zur Kontrollgruppe versechsfachte sich der Wert in den V1-Venolen (364 ± 23 vs. 62 ± 10 n/mm²). In den V3-Venolen war der Wert nahezu verfünffacht (470 ± 21 vs. 96 ± 14 n/mm²; $p < 0.05$). Die Behandlungsgruppen wiesen abgestufte Veränderungen auf. Eine Gabe von Oxypurinol führte zu einer Verringerung des Leukozytenstickings in den V1-Venolen um 18 % (301 ± 16 n/mm²) bzw. 17 % (390 ± 20 n/mm²) in den V3-Venolen ($p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe). Signifikant effektiver war die Gabe von U-74389G. Hierbei verringerte sich die feste Leukozytenadhärenz um 41 % (216 ± 15 n/mm²) in den V1-Venolen und um 34 % (310 ± 21 n/mm²) in den V3-Venolen ($p < 0.05$ vs. LPS- und Oxypurinol-Gruppe).

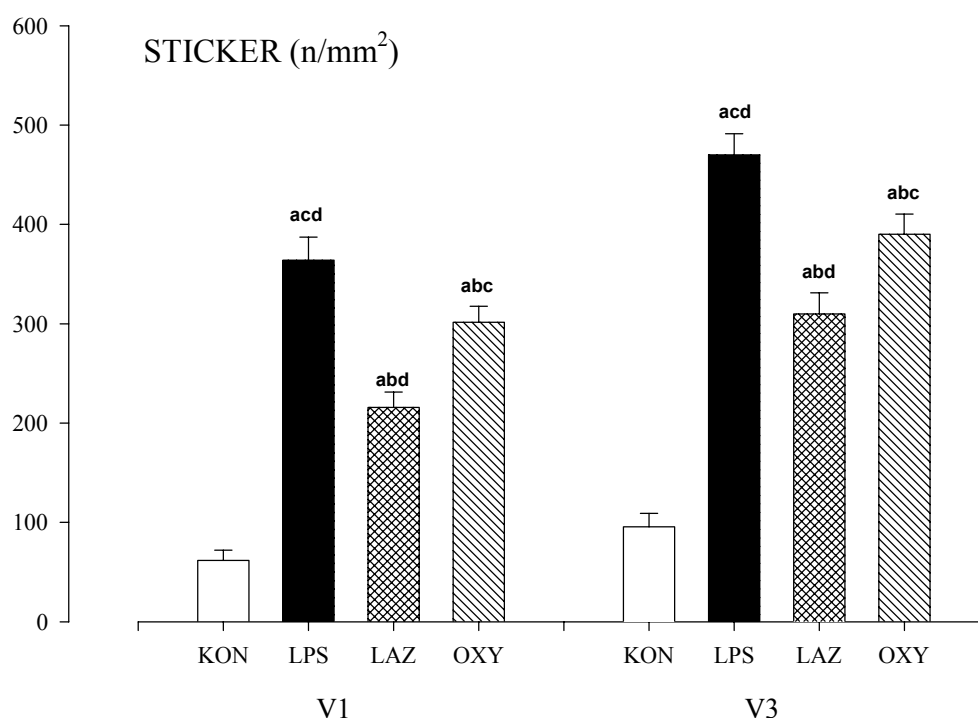


Abb. 36: 20 mg/kg KG LPS - Anzahl stickender Leukozyten in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je $n = 20$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe ^c $p < 0.05$ vs. Lazaroid-Gruppe, ^d $p < 0.05$ vs. Oxypurinol-Gruppe

5.1.2.3 Funktionelle Kapillardichte

Mukosa und Muskularis

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Bei einer Dosierung von 5 mg/kg LPS fanden wir keine Beeinflussung der funktionellen Kapillardichte in den Villi intestinales der Darmmukosa nach zweistündiger Endotoxinämie (Abb. 39). Auch in der longitudinalen und zirkulären Dünndarmmuskulatur fanden sich keine Veränderungen der FCD. Die größte Kapillardichte fand sich in der Mukosa ($500\text{--}550\text{ cm}^{-1}$). Die zirkuläre Darmmuskulatur wies eine größere Kapillardichte auf als die longitudinale Muskularis ($250\text{--}300\text{ mm}^{-1}$ vs. $150\text{--}200\text{ mm}^{-1}$; Abb. 40).

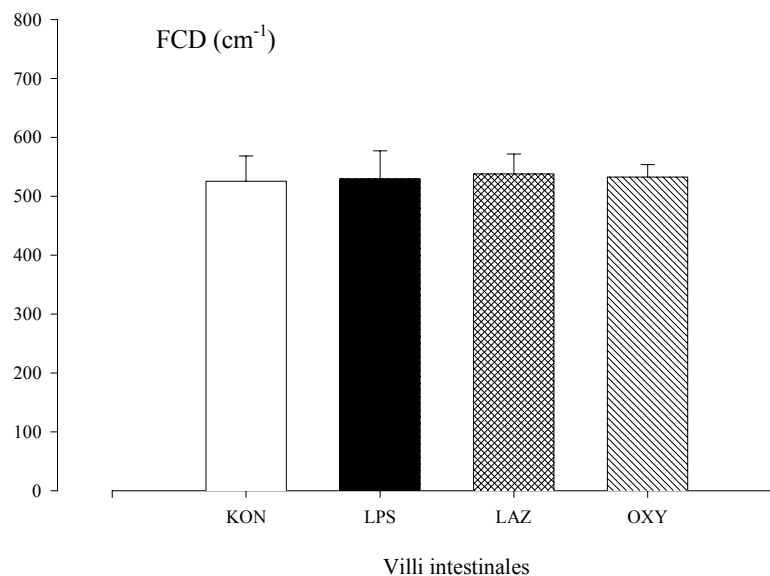


Abb. 37: 5 mg/kg KG LPS - Funktionelle Kapillardichte (FCD; cm^{-1}) der Villi intestinales; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je $n = 20$)

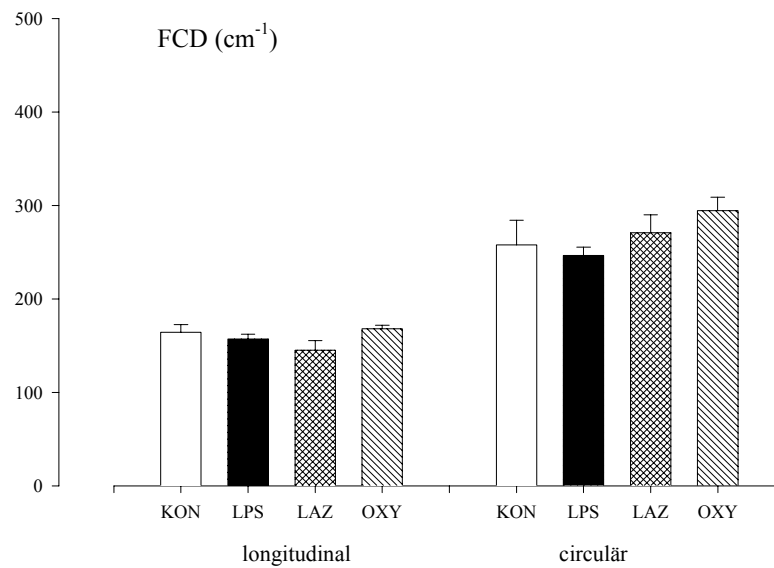


Abb. 38: 5 mg/kg KG LPS - Funktionelle Kapillardichte (FCD; cm^{-1}) der longitudinalen und circulären Dünndarmmuskulatur; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je $n = 20$)

Mukosa und Muskularis

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS blieb die funktionelle Kapillardichte in der Mukosa intakt (Abb. 32). Die tendenzielle Erniedrigung in der Lazaroid-Gruppe war statistisch nicht signifikant ($390 \pm 99 \text{ mm}^{-1}$ vs. $525 \pm 43 \text{ mm}^{-1}$ in der Kontrollgruppe). In der Muskularis sahen wir signifikante Perfusionsausfälle. Sowohl in der Lazaroid-behandelten als auch in der unbehandelten LPS-Gruppe verringerte sich die FCD um 33 % in der longitudinalen Dünndarmmuskulatur. In der zirkulären Muskularisschicht beobachteten wir sogar eine um 48% reduzierte funktionelle Kapillardichte ($p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe). Die Behandlung mit Oxypurinol führte zu einer signifikanten Verbesserung der FCD in der longitudinalen Muskularis ($p < 0.05$ vs. LPS- und Lazaroid-Gruppe). Hier konnten Normalwerte beobachtet werden ($152 \pm 14 \text{ cm}^{-1}$). In der schwerer geschädigten zirkulären Schicht war der Effekt geringer ausgeprägt. Die FCD-Reduktion betrug noch 21 % ($p < 0.05$ vs. Kontroll-, LPS- und Lazaroidgruppe; Abb. 42).

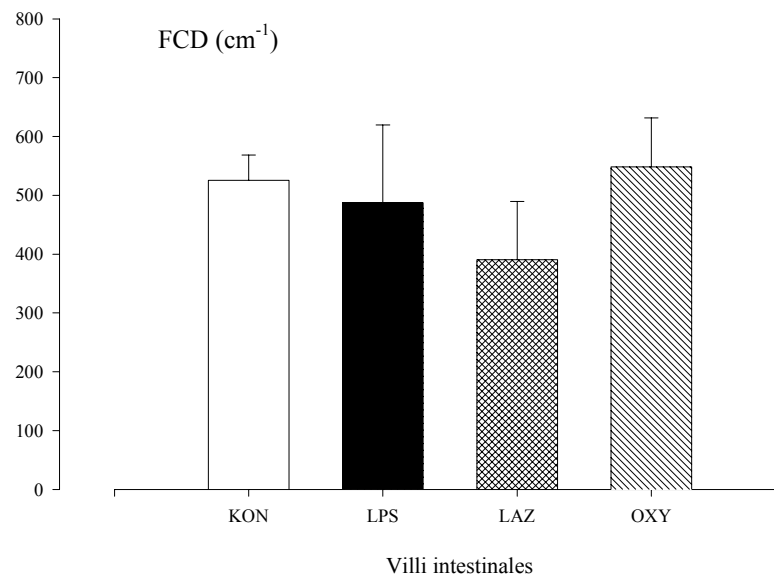


Abb. 39: 20 mg/kg KG LPS - Funktionelle Kapillardichte (FCD; cm⁻¹) der Villi intestinales; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je n = 20)

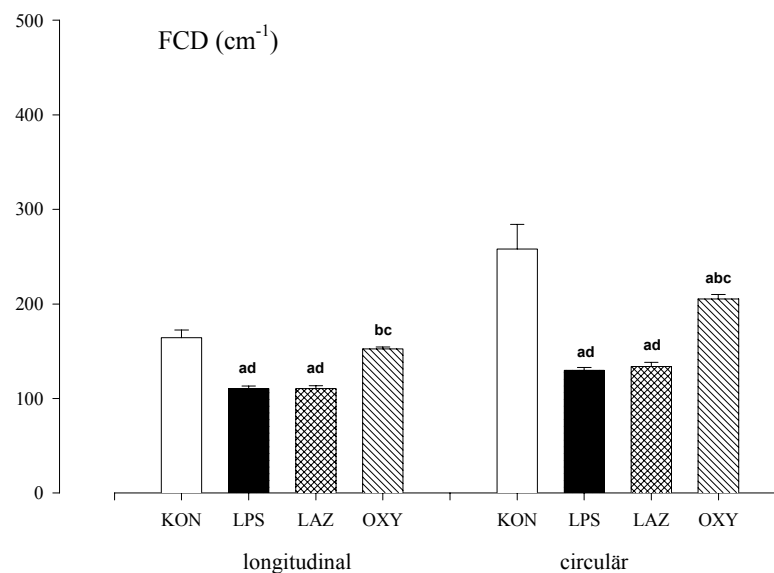


Abb. 40: 20 mg/kg KG LPS - FCD der longitudinalen und circulären Dünndarmmuskulatur (cm⁻¹); Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, LAZ = Lazaroid-Gruppe, OXY = Oxypurinol-Gruppe (je n = 20); ^a p<0.05 vs. Kontrollgruppe, ^b p<0.05 vs. LPS-Gruppe ^c p<0.05 vs. Lazaroid-Gruppe, ^d p<0.05 vs. Oxypurinol-Gruppe

5.1.3 Tumornekrosefaktor- α

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Ein signifikanter Anstieg der TNF- α -Konzentration zeigte sich in allen Gruppen nach LPS-Applikation. Die TNF- α -Freisetzung zwei Stunden nach LPS-Applikation lag in der unbehandelten Gruppe im Vergleich zu den mit dem Lazaroid U-74389G bzw. Oxypurinol behandelten Versuchsgruppen signifikant höher (4041 ± 871 vs. 1627 ± 474 bzw. 1846 ± 350 pg/ml; $p < 0.05$). Dies entspricht einer Reduktion des TNF- α -Peaks um 60 % durch die Lazaroid-Behandlung und um 54 % bei Oxypurinol-Gabe. Vier Stunden nach Endotoxinapplikation waren die TNF- α -Werte von LPS- und Oxypurinol-Gruppe gegenüber der Kontroll- und Lazaroid-Gruppe signifikant erhöht. Alle Gruppen, die LPS erhalten hatten, unterschieden sich vier Stunden nach LPS-Applikation noch signifikant vom 0 h-Wert.

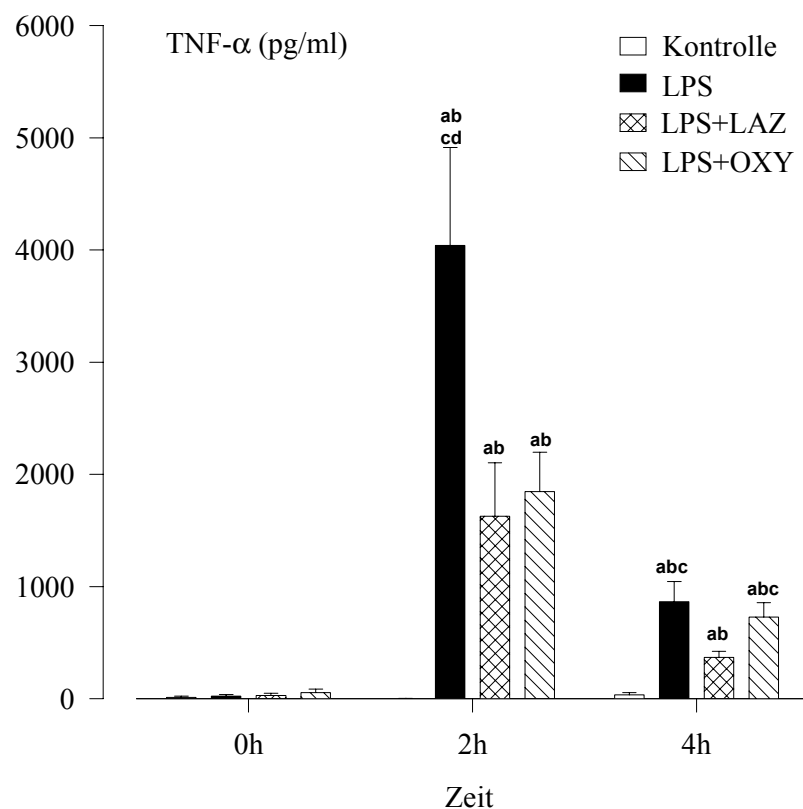


Abb. 41: 5 mg/kg KG LPS - Tumornekrosefaktor- α (TNF- α); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. Ausgangswert, ^c $p < 0.05$ vs. LPS+LAZ, ^d $p < 0.05$ vs. LPS+OXY

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Auch nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS konnte eine signifikante TNF- α -Freisetzung in allen Gruppen registriert werden. Die Spitzenspiegel waren jedoch bereits nach zwei Stunden nicht mehr so hoch wie in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. In der unbehandelten LPS-Gruppe betrug die TNF- α -Konzentration 1909 ± 568 pg/ml (Lazaroid-Gruppe: 1953 ± 395 , Oxypurinol-Gruppe: 2469 ± 201 pg/ml).

Nach vier Stunden beobachteten wir in allen mit LPS belasteten Gruppen einen weiteren Rückgang der TNF- α -Konzentration. Die Gruppen, die LPS erhalten hatten, unterschieden sich vier Stunden nach LPS-Applikation ebenfalls signifikant vom Ausgangswert ($p < 0.05$).

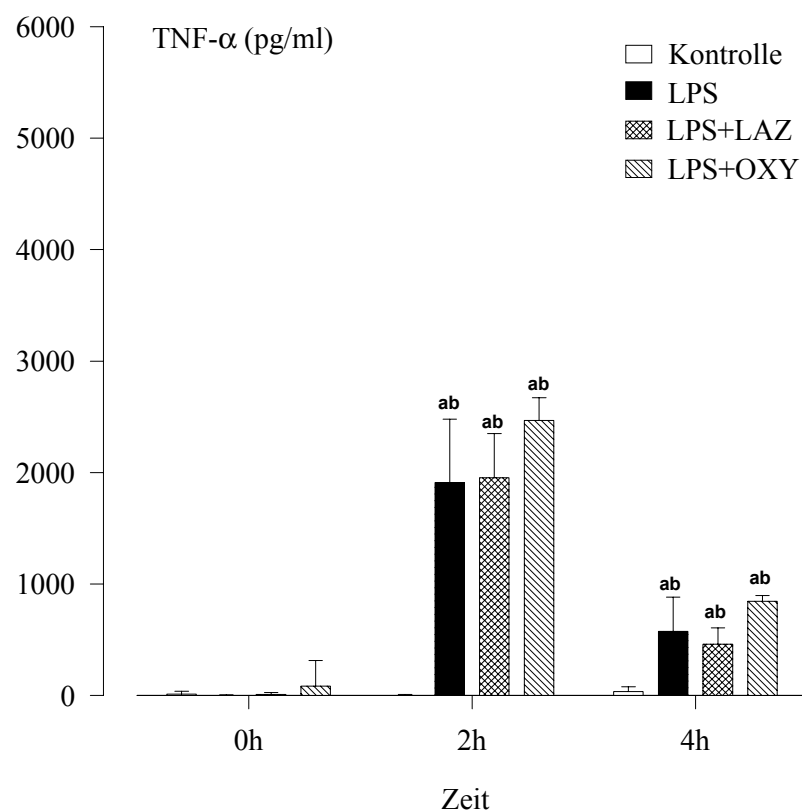


Abb. 42: 20 mg/kg KG LPS - Tumornekrosefaktor- α (TNF- α); Mittelwert \pm SEM; n = 20;

^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. Ausgangswert

5.1.4 Malondialdehyd

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Bei Belastung mit 5 mg/kg KG LPS fanden wir einen signifikanten Anstieg der MDA-Konzentration im Dünndarmgewebe zum Zeitpunkt zwei Stunden in der unbehandelten LPS-Gruppe. Gegenüber dem Ausgangswert wurden durchschnittlich um 116 % höhere Werte gemessen ($p < 0.05$ gegenüber Ausgangswert und allen anderen Gruppen).

Vier Stunden nach Endotoxin-Applikation waren die MDA-Werte im Darmgewebe der unbehandelten LPS-Gruppe rückläufig, jedoch noch signifikant gegenüber dem Vergleichswert in der Kontroll-Gruppe erhöht ($p < 0.05$).

Sowohl die Gabe des Lazaroids U-74389G als auch die Applikation von Oxypurinol konnte eine MDA-Bildung im Dünndarmgewebe verhindern.

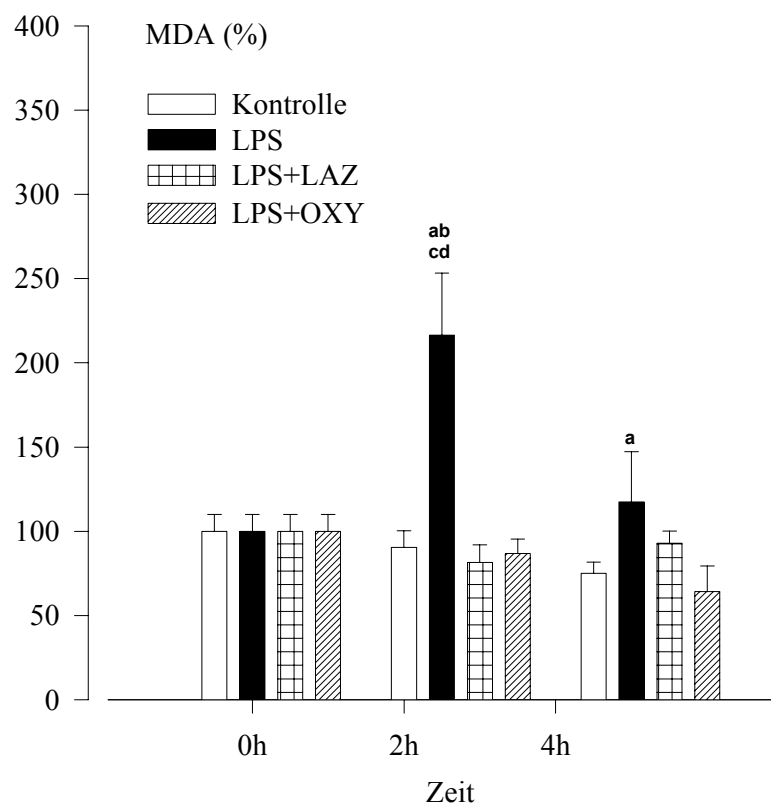


Abb. 43: 5 mg/kg KG LPS – Malondialdehyd (MDA) im Dünndarmgewebe, Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. Ausgangswert, ^c $p < 0.05$ vs. Lazaroid-Gruppe, ^d $p < 0.05$ vs. Oxypurinol-Gruppe

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Nach Applikation von 20 mg/kg KG LPS stieg in der unbehandelten LPS-Gruppe die MDA-Konzentration auf 140 ± 12 % vom Ausgangswert an ($p < 0.05$ vs. Kontroll- und Ausgangswert).

Nach vier Stunden waren die MDA-Werte im Darmgewebe in allen Endotoxin-belasteten Gruppen signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe erhöht (LPS-Gruppe: 119 ± 16 %, Lazaroid-Gruppe: 113 ± 9 %, Oxypurinol-Gruppe: 136 ± 8 %). Zwischen den LPS-belasteten Gruppen bestand zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied.

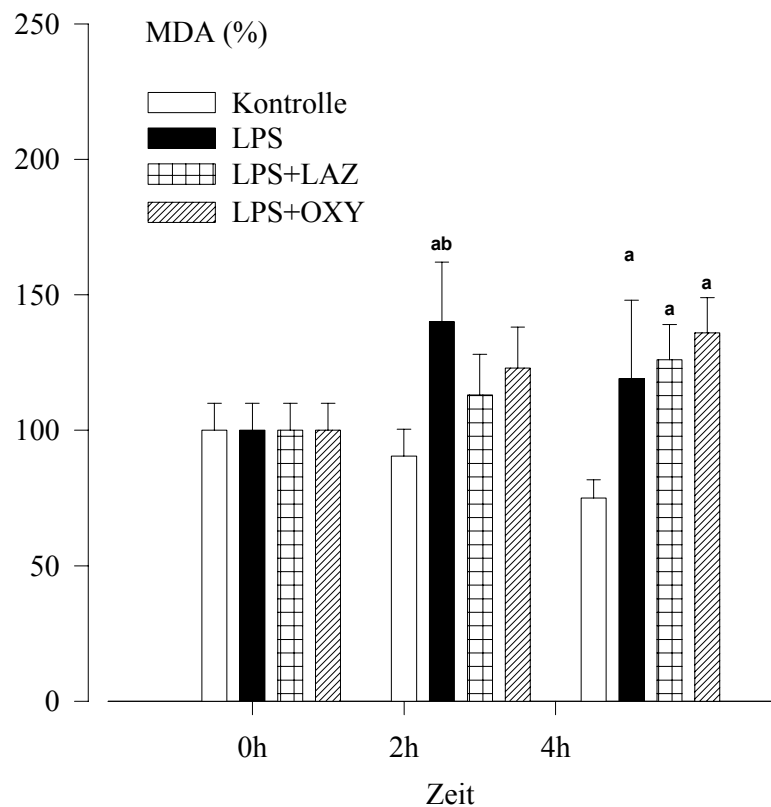


Abb. 44: 20 mg/kg KG LPS – Malondialdehyd (MDA) im Dünndarmgewebe, Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. Ausgangswert

5.2 Teil 2 – vasoaktive Substanzen

5.2.1 Klinische Parameter

5.2.1.1 Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Herzfrequenz (Abb. 47) – Die Ausgangswerte der Herzfrequenz waren in allen Versuchsgruppen vergleichbar. Nach Endotoxingabe entwickelte sich eine Tachykardie, die in der LPS-Gruppe ab dem Zeitpunkt 1 h, in der mit Iloprost behandelten Gruppe (LPS+ILO-Gruppe) ab dem Zeitpunkt 1,5 h und in der mit Dopexamin behandelten Gruppe (LPS+DPX-Gruppe) nach zwei Stunden statistisch signifikant war ($p < 0.05$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand die Signifikanz ab dem Zeitpunkt 1,5 h für die LPS-Gruppe, ab dem Zeitpunkt 3 h für alle LPS-belasteten Gruppen. Die Herzfrequenz in der unbehandelten LPS-Gruppe lag deutlich über der Herzfrequenz in den Therapiegruppen. Dies erreichte nach vier Stunden Versuchsdauer statistische Signifikanz ($p < 0.05$).

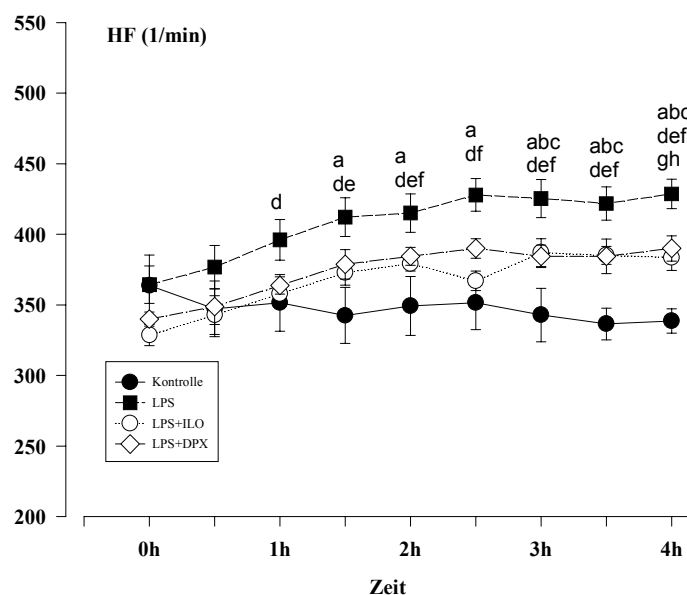


Abb. 45: 5 mg/kg KG LPS – Herzfrequenz (HF); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX; ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS+ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h, ^g $p < 0.05$ LPS vs. LPS+ILO, ^h $p < 0.05$ LPS vs. LPS+DPX

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP, Abb. 48) – Nach vergleichbaren Ausgangswerten (Kontroll-Gruppe: 110 ± 5 mmHg, LPS-Gruppe: 105 ± 9 mmHg, LPS+ILO-Gruppe: 113 ± 4 mmHg, LPS+DPX-Gruppe: 112 ± 4 mmHg; Mittelwert \pm SEM) beobachteten wir 30 Minuten nach Versuchsbeginn in der unbehandelten LPS-Gruppe einen signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks auf 81 ± 10 mmHg ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, LPS-ILO und LPS-DPX).

Der MAP erholte sich jedoch rasch und unterschied sich in der Folge nicht mehr statistisch signifikant von den Werten der anderen Gruppen, obwohl er das Ausgangsniveau nicht erreichte. In den anderen Versuchsgruppen kam es im Beobachtungszeitraum nur zu einem moderaten Blutdruckabfall.

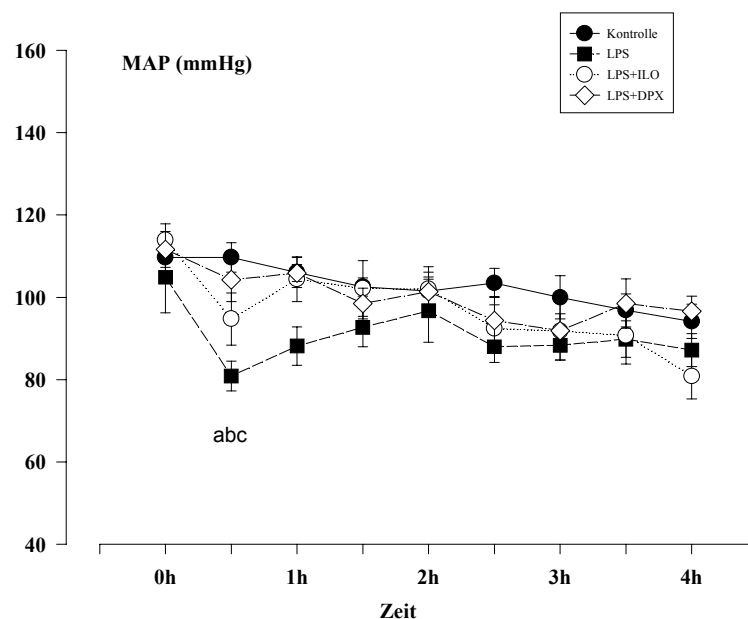


Abb. 46: 5 mg/kg KG LPS - Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS, ^c $p < 0.05$ LPS-DPX vs. LPS (jeweils zum gleichen Zeitpunkt)

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Herzfrequenz (Abb. 49) – Analog zur Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS beobachteten wir nach erhöhter Endotoxinbelastung eine signifikante Zunahme der Herzfrequenz.

Sehr frühzeitig trat dies bei den zusätzlich mit Dopexamin behandelten Tieren auf ($p < 0.05$ ab Zeitpunkt 0,5 h). In der unbehandelten LPS-Gruppe und in der LPS+ILO-Gruppe begannen die statistisch signifikanten Veränderungen ab dem Zeitpunkt 2 h.

Bis zum Versuchsende war die Herzfrequenz in allen Versuchsgruppen erhöht ($p < 0.05$). Obwohl die Dopexamin-Gruppe initial die höchsten Herzfrequenzwerte aufwies, war am Ende des Versuchszeitraumes in der Iloprost-Gruppe der größte Herzfrequenzanstieg zu verzeichnen.

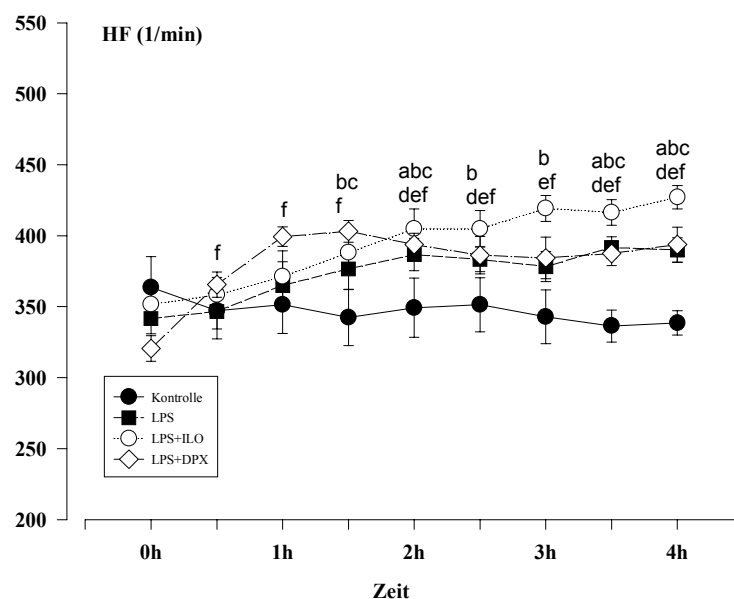


Abb. 47: 20 mg/kg KG LPS – Herzfrequenz (HF); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX; ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS+ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h

Mittlerer arterieller Blutdruck (Abb. 50) – Der Blutdruckabfall nach Applikation von 20 mg/kg KG LPS war stärker ausgeprägt als in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. Der mittlere arterielle Blutdruck sank in der LPS-Gruppe von 116 ± 4 mmHg auf 74 ± 2 mmHg und in der LPS+DPX-Gruppe von 120 ± 6 mmHg auf 70 ± 2 mmHg. In der Gruppe mit Iloprost-Therapie war der Blutdruckabfall ebenfalls signifikant. Er erreichte jedoch nur ein Niveau von 88 ± 5 mmHg. Die statistische Überprüfung ergab Signifikanzen aller LPS-belasteten Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert und zum Vergleichswert in der Kontrollgruppe ($p < 0.05$).

Am schnellsten stabilisierte sich der MAP in der Dopexamin-Gruppe. In der unbehandelten LPS-Gruppe blieb die MAP-Reduktion bis zum Zeitpunkt 1h nach LPS-Applikation gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0.05$). Im Vergleich zu den Ausgangswerten war der mittlere arterielle Blutdruck bei allen Tieren mit Endotoxinämie ab dem Zeitpunkt 1,5 h signifikant erniedrigt ($p < 0.05$).

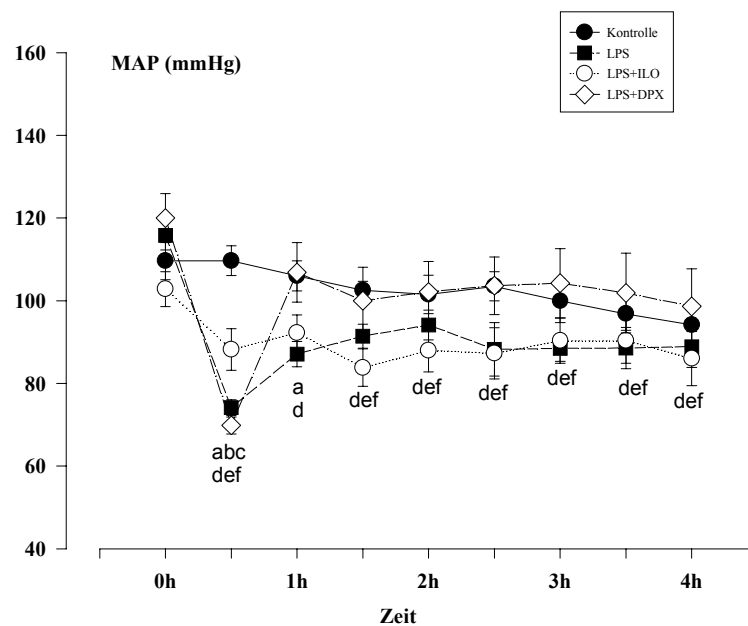


Abb. 48: 20 mg/kg KG LPS - Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP); Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX; ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS+ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h

5.2.1.2 Sauerstoffpartialdruck, Kohlendioxidpartialdruck, pH-Wert

Versuchsreihen mit 5/20 mg/kg KG LPS

Sauerstoffpartialdruck (pO₂, Tabellen 9, 10) – Die pO₂-Werte aller Tiere lagen im gesamten Versuchsablauf im normoxischen Bereich (9,08-14,06 kPa). In beiden Versuchsreihen waren nach Narkoseeinleitung teilweise signifikant ansteigende pO₂-Werte zu beobachten. Lediglich in den unbehandelten LPS-Gruppen fehlte dieser Anstieg. In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS sahen wir einen signifikant niedrigeren pO₂ in der unbehandelten LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- und Dopexamin-Gruppe vier Stunden nach Induktion der Endotoxinämie.

Tabelle 9: 5 mg/kg KG LPS - Sauerstoffpartialdruck (pO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20;

^a p<0,05 vs. Ausgangswert, ^b p<0.05 vs. LPS-Gruppe

PO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	10,75 ± 1,08	11,48 ± 3,46	14,06 ± 1,51 ^{a,b}
LPS	12,10 ± 3,41	12,31 ± 2,83	9,84 ± 1,32
LPS+ILO	10,53 ± 1,41	12,55 ± 1,29 ^a	12,67 ± 1,97 ^a
LPS+DPX	10,15 ± 1,12	13,18 ± 1,50 ^a	13,14 ± 1,12 ^{a,b}

Tabelle 10: 20 mg/kg KG LPS - Sauerstoffpartialdruck (pO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20;

^a p<0,05 vs. Ausgangswert, ^b p<0.05 vs. 2 h-Wert derselben Gruppe

PO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	10,75 ± 1,08	11,48 ± 3,46	14,06 ± 1,51 ^a
LPS	9,85 ± 3,93	10,90 ± 1,52	11,83 ± 3,57
LPS+ILO	9,08 ± 1,22	12,17 ± 2,17 ^a	10,25 ± 1,79
LPS+DPX	9,42 ± 1,64	12,74 ± 1,24 ^a	10,21 ± 2,55 ^b

Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂, Tabellen 11, 12) – Wir beobachteten in allen Gruppen normokapnische Ausgangswerte. Im weiteren Versuchsablauf fanden wir signifikante Verschiebungen hin zu niedrigeren Werten in allen Versuchsgruppen (p<0.05 nach vier Stunden). Eine Ausnahme bildete die unbehandelte LPS-Gruppe mit 5 mg/kg KG LPS.

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede während der gesamten Versuchsdauer.

Tabelle 11: 5 mg/kg KG LPS - Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20; ^a p<0.05 vs. Ausgangswert

pCO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	5,27 ± 0,43	4,55 ± 0,39	3,85 ± 0,67 ^a
LPS	4,62 ± 1,06	3,61 ± 0,97	4,03 ± 0,63
LPS+ILO	5,64 ± 0,66	4,16 ± 0,64 ^a	4,20 ± 0,52 ^a
LPS+DPX	5,69 ± 0,72	4,17 ± 0,73 ^a	3,58 ± 0,47 ^a

Tabelle 12: 20 mg/kg KG LPS - Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂ [kPa]); Mittelwert ± SD; n = 20; ^a p<0.05 vs. Ausgangswert

pCO ₂	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	5,27 ± 0,43	4,55 ± 0,39	3,85 ± 0,67 ^a
LPS	5,80 ± 1,36	3,97 ± 0,28 ^a	3,03 ± 0,64 ^a
LPS+ILO	5,85 ± 0,63	4,23 ± 0,98 ^a	3,83 ± 0,79 ^a
LPS+DPX	5,80 ± 0,64	4,34 ± 0,49 ^a	4,09 ± 0,69 ^a

pH-Wert (Tabellen 13, 14) – Die pH-Werte lagen im Normbereich und zeigten bis auf eine Ausnahme (s.u.) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der Messzeitpunkte und innerhalb der einzelnen Gruppen. Wie im ersten Teil der Studie zeichnete sich ein leichter Trend zu alkalischeren Werten während des Beobachtungszeitraumes ab. Nur in der Kontrollgruppe erreichte dies statistische Signifikanz ($p < 0.05$ nach vier Stunden).

Tabelle 13: 5 mg/kg KG LPS - pH-Wert; Mittelwert \pm SD; n = 20

pH	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	7,42 \pm 0,01	7,44 \pm 0,02	7,49 \pm 0,06 ^a
LPS	7,44 \pm 0,03	7,47 \pm 0,03	7,47 \pm 0,06
LPS+ILO	7,45 \pm 0,054	7,45 \pm 0,039	7,48 \pm 0,027
LPS+DPX	7,44 \pm 0,022	7,44 \pm 0,046	7,48 \pm 0,036

Tabelle 14: 20 mg/kg KG LPS - pH-Wert; Mittelwert \pm SD; n = 20; ^a $p < 0,05$ vs. Ausgangswert

pH	0 h	2 h	4 h
Kontrolle	7,42 \pm 0,01	7,44 \pm 0,02	7,49 \pm 0,06 ^a
LPS	7,43 \pm 0,07	7,49 \pm 0,05	7,41 \pm 0,12
LPS+ILO	7,45 \pm 0,054	7,45 \pm 0,039	7,48 \pm 0,027
LPS+DPX	7,44 \pm 0,022	7,44 \pm 0,046	7,48 \pm 0,036

5.2.1.3 Laktat

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Die Ausgangswerte der Laktatkonzentrationen lagen bei allen Tieren im Normbereich. Der Laktatspiegel der Kontrollgruppe blieb stabil.

In allen Gruppen, die LPS erhalten hatten, beobachteten wir im weiteren Verlauf ansteigende Laktatwerte ($p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 2 h und 4 h). Maximal wurden Werte um 5 mmol/l gemessen.

Zwischen den Gruppen mit Endotoxinämie gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

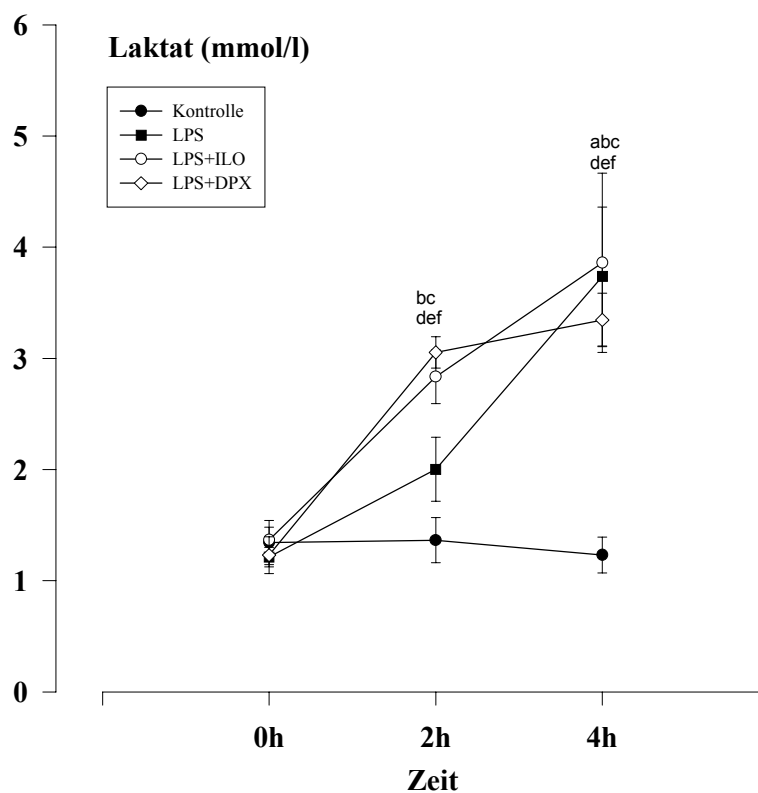


Abb. 49: 5 mg/kg KG LPS - Laktat; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS-ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS kam es analog zur Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS in allen Endotoxin-Gruppen zu einem Anstieg der Laktatwerte.

Dieser Anstieg war zum Zeitpunkt 2 h und 4 h signifikant gegenüber den Ausgangswerten und den Vergleichswerten der Kontrollgruppe ($p < 0.05$). Es wurde ein ähnliches Niveau der Laktatwerte erreicht, wie in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS (maximale Werte um 5 mmol/l).

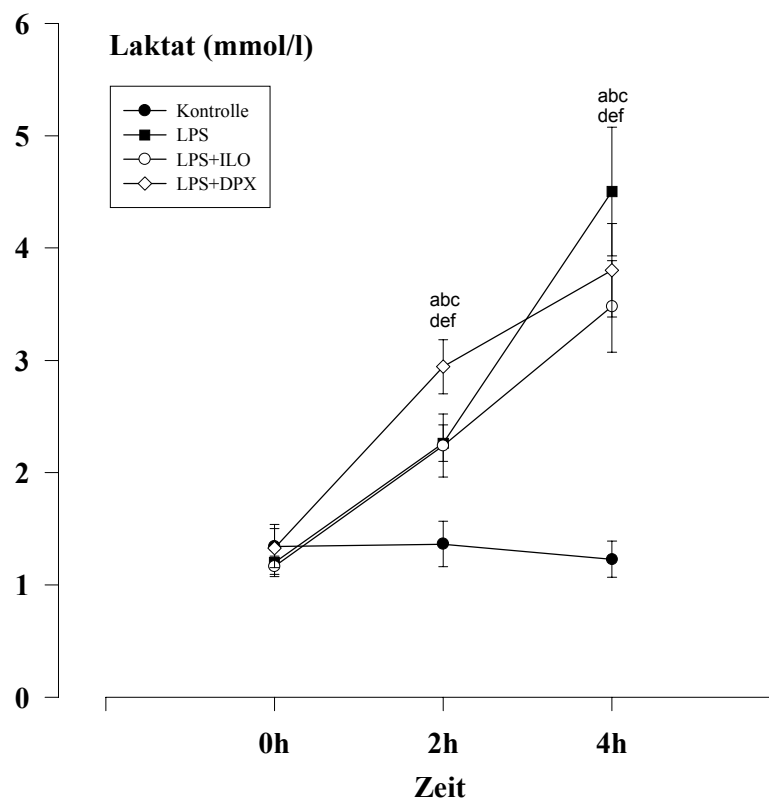


Abb. 50: 20 mg/kg KG LPS - Laktat; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS+ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h

5.2.1.4 Leukozyten

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Die Ausgangswerte der Leukozytenzahl im peripheren Blut aller Versuchsgruppen waren vergleichbar und lagen im Normbereich.

Nach Induktion der Endotoxinämie kam es zu einer drastischen Reduktion der Leukozytenzahl in den betreffenden Gruppen. In der unbehandelten LPS-Gruppe sank die Leukozytenzahl von $4,4 \pm 0,8$ Gpt/l auf $1,4 \pm 0,2$ Gpt/l ab (- 69 %; $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe und Ausgangswert). Eine Behandlung der Tiere mit Iloprost hatte keinen Einfluss auf die Leukopenie. Bei Gabe von Dopexamin fiel die Leukozytenzahl langsamer, erreichte aber nach vier Stunden das gleiche Niveau wie in der Iloprost- und LPS-Gruppe.

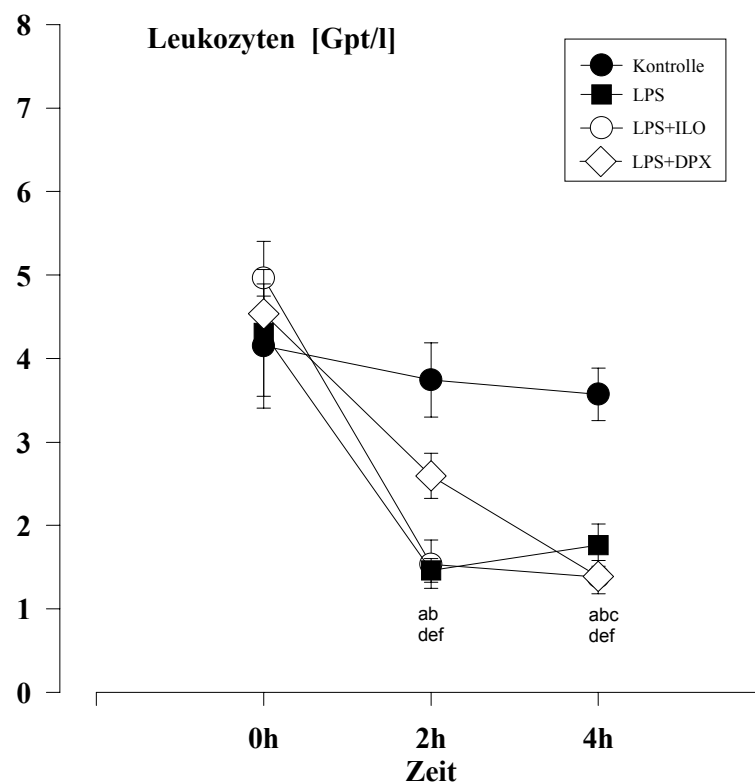


Abb. 51: 5 mg/kg KG LPS – Leukozytenzahl; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS+ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Die Leukozytenzahlen waren auch in dieser Versuchsreihe zu Beginn des Experiments im Normbereich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Unter erhöhter Endotoxin-Belastung kam es bereits nach zwei Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl in allen Gruppen, die LPS erhalten hatten ($p < 0.05$ vs. Ausgangswert und Vergleichswert in der Kontroll-Gruppe). Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen wurde nicht verzeichnet.

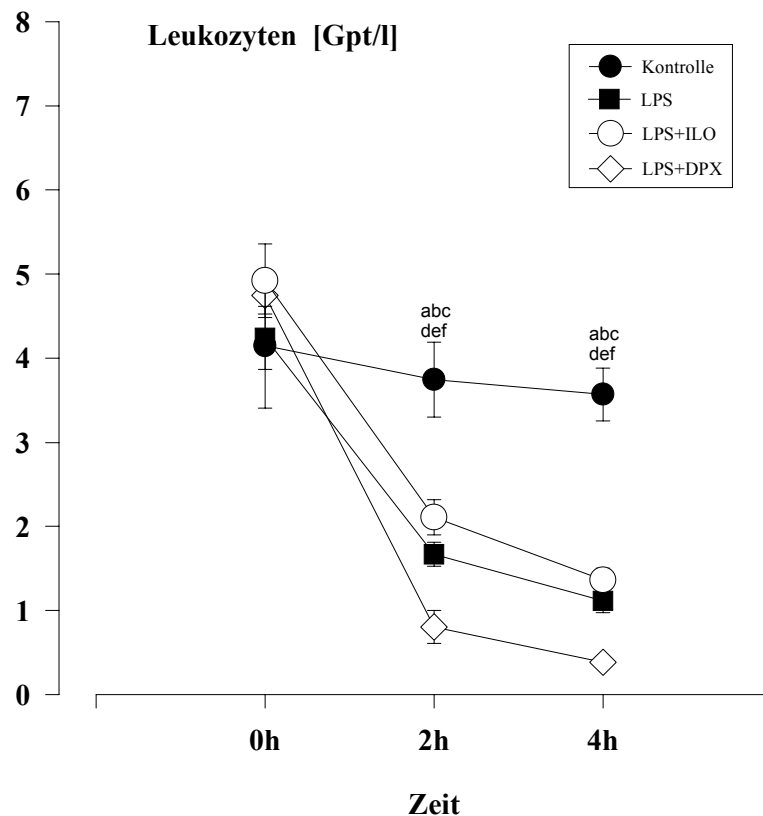


Abb. 52: 20 mg/kg KG LPS – Leukozytenzahl; Mittelwert \pm SEM; $n = 20$; ^a $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS, ^b $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+ILO, ^c $p < 0.05$ Kontrolle vs. LPS+DPX, ^d $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^e $p < 0.05$ LPS+ILO vs. LPS-ILO 0h, ^f $p < 0.05$ LPS+DPX vs. LPS+DPX 0h

5.2.2 Intravitalmikroskopie

5.2.2.1 Roller-Flow

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Zwei Stunden nach intravenöser Gabe von 5 mg/kg KG Lipopolysaccharid fanden sich signifikant weniger Leukozyten, die temporär am venolären Endothel adhärten (Roller-Flow). Diese Beobachtung traf gleichermaßen für die postkapillären (V3) als auch die Sammel-Venolen (V1) zu (siehe Teil 1). In der unbehandelten LPS-Gruppe verringerte sich die Anzahl rollender Leukozyten in den V1-Venolen auf 15 ± 3 n/min (Kontrollgruppe: 50 ± 6 ; $p < 0.05$). In den V3-Venolen kam es zu einem Rückgang auf 9 ± 2 n/min (Kontrollgruppe: 61 ± 5 ; $p < 0.05$). Ein Effekt der therapeutisch eingesetzten Substanzen auf diesen Parameter ließ sich nicht nachweisen. Sowohl in der Iloprost- als auch in der Dopexamin-Gruppe kam es analog zu einem signifikanten Rückgang des Roller-Flows.

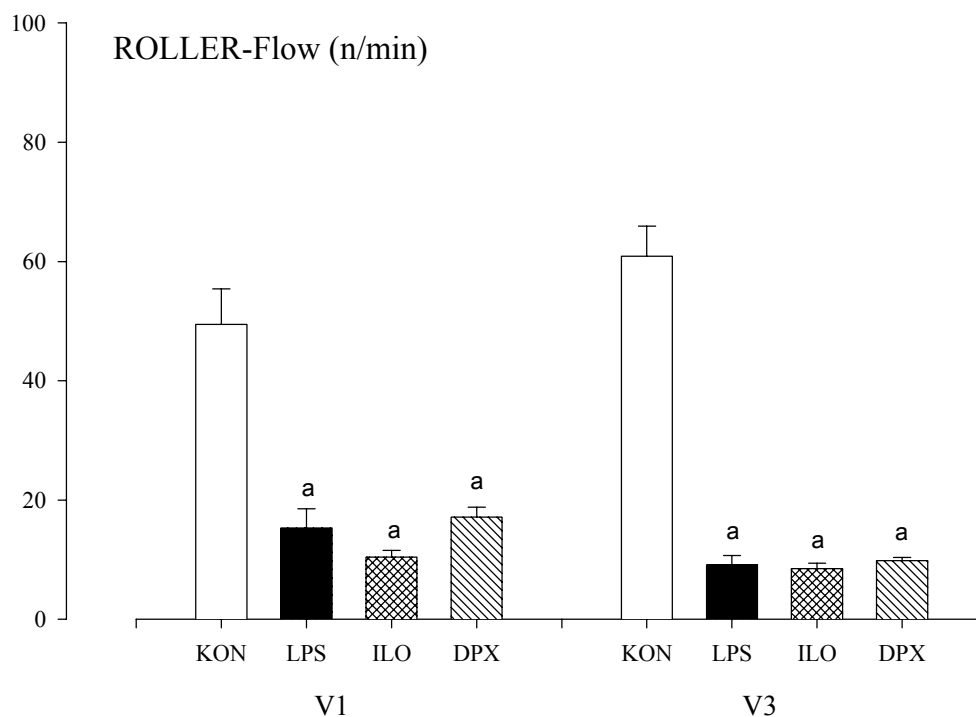


Abb. 53: 5 mg/kg KG LPS – Roller-Flow in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je $n = 10$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Nach Gabe von 20 mg/kg KG Lipopolysaccharid kam es zu dem bereits im Teil 1 beschriebenen weiteren Rückgang der Anzahl temporär mit dem Gefäßendothel interagierender Leukozyten auf 23% (11 ± 1 n/min) in den V1-Venolen und 12 % (8 ± 1 n/min) in den V3-Venolen (im Vergleich zur Kontroll-Gruppe; $p < 0.05$). Ebenso wie bei Belastung mit 5 mg/kg KG Lipopolysaccharid ließ sich ein Effekt der eingesetzten Substanzen auf diesen Parameter nicht nachweisen. Der Roller-Flow in den V1-Venolen verminderte sich auf 25 % (12 ± 3 n/min) in der Iloprost-Gruppe und auf 30 % (15 ± 3 n/min) in der Dopexamin-Gruppe (n.s. im Vergleich zur LPS-Gruppe). In den V3-Venolen ging der Roller-Flow in der mit Iloprost behandelten Gruppe auf 13 % (9 ± 2 n/min) und in der Dopexamin-behandelten Gruppe auf 11 % (7 ± 1 n/min) zurück (n.s. im Vergleich zur LPS-Gruppe).

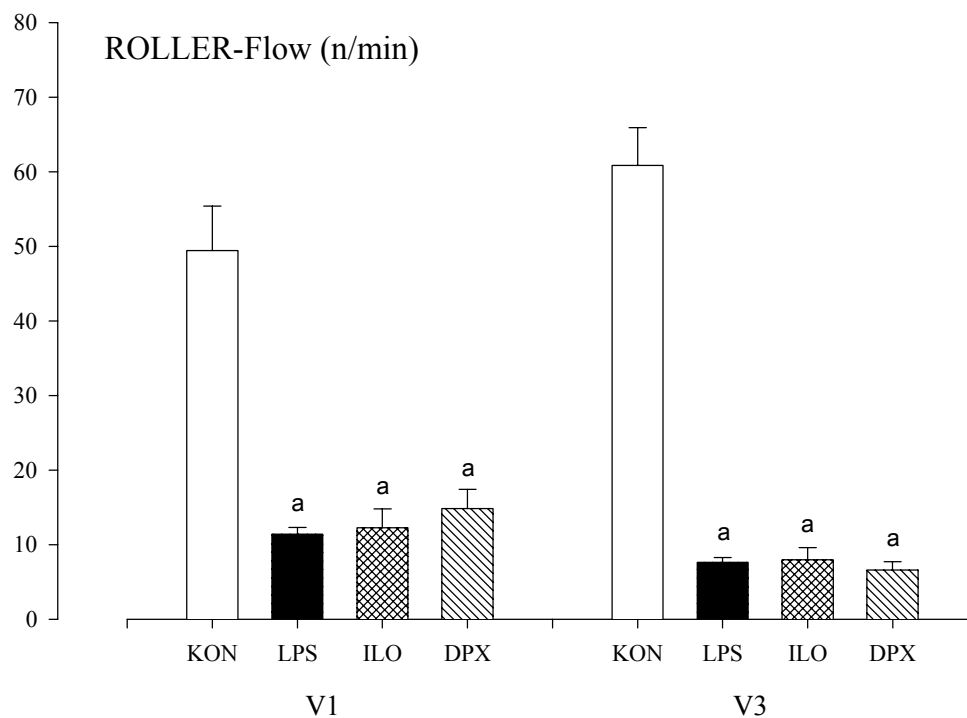


Abb. 54: 20 mg/kg KG LPS – Roller-Flow in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je $n = 10$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe

5.2.2.2 Sticker

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Bei Belastung mit 5 mg/kg KG Endotoxin kam es zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl fest mit dem Venolen-Endothel adhärrierender Leukozyten. In den V1-Venolen zeigte sich ein Anstieg dieses Parameters auf 384 %, in den V3-Venolen auf 418 % im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die Applikation von Iloprost konnte weder in den V1- noch in den V3-Venolen die Leukozytenadhärenz signifikant vermindern (V1: 418 %, V3: 395 %; n.s. im Vergleich zur LPS-Gruppe). Eine kontinuierliche Infusion mit Dopexamin verringerte jedoch die Anzahl fest adhärenter Leukozyten in den V1-Venolen um ein Viertel (73% der LPS-Gruppe). In den V3-Venolen betrug die Verminderung der Leukozytenadhärenz durch die Gabe von Dopexamin 30 % ($p < 0.05$ vs. Kontroll-, LPS- und Iloprost-Gruppe).

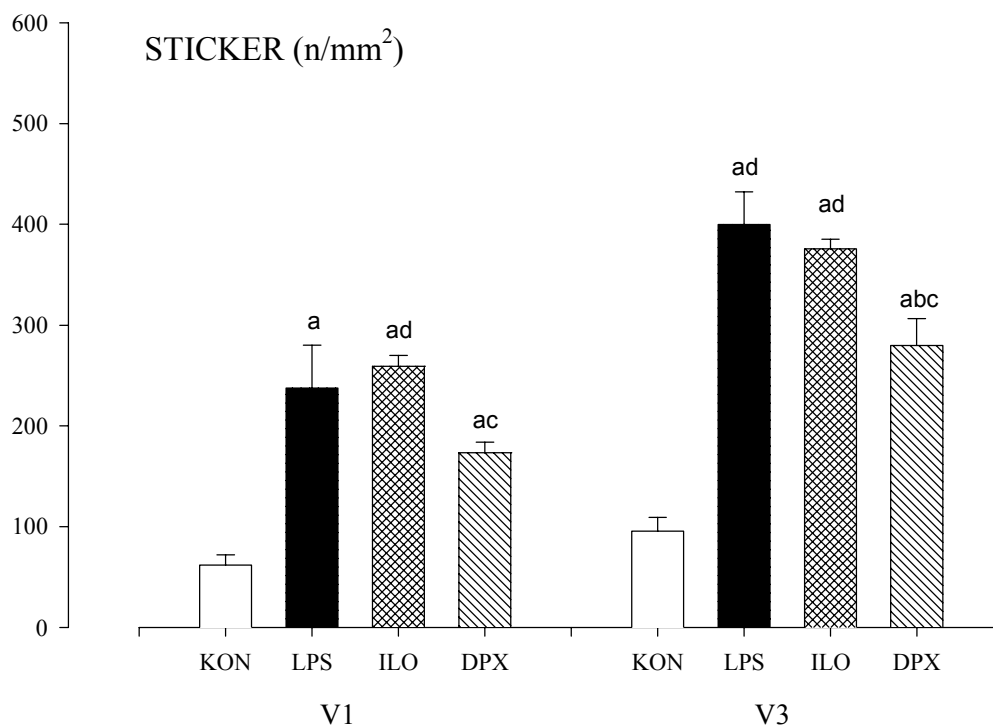


Abb. 55: 5 mg/kg KG LPS – Anzahl stickender Leukozyten in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je $n = 10$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe, ^c $p < 0.05$ vs. Iloprost-Gruppe, ^d $p < 0.05$ vs. Dopexamin-Gruppe

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

In der Versuchsreihe mit erhöhter Endotoxin-Belastung (20 mg/kg KG Lipopolysaccharid) beobachteten wir einen gleichartigen Effekt der beiden vasoaktiven Substanzen auf die Anzahl fest am Endothel haftender Leukozyten. In der Gefäßsubpopulation der V1-Venolen der intestinalen Submukosa kam es zu einer signifikanten Reduktion der Endotoxin-induzierten festen Leukozytenadhärenz um 31 % ($p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe). Der gleiche Trend war auch in den V3-Venolen erkennbar (- 16 % im Vergleich zur LPS-Gruppe), erreichte aber keine statistische Signifikanz. Die Veränderungen in der unbehandelten LPS-Gruppe wurden bereits ausführlich im Teil 1 beschrieben.

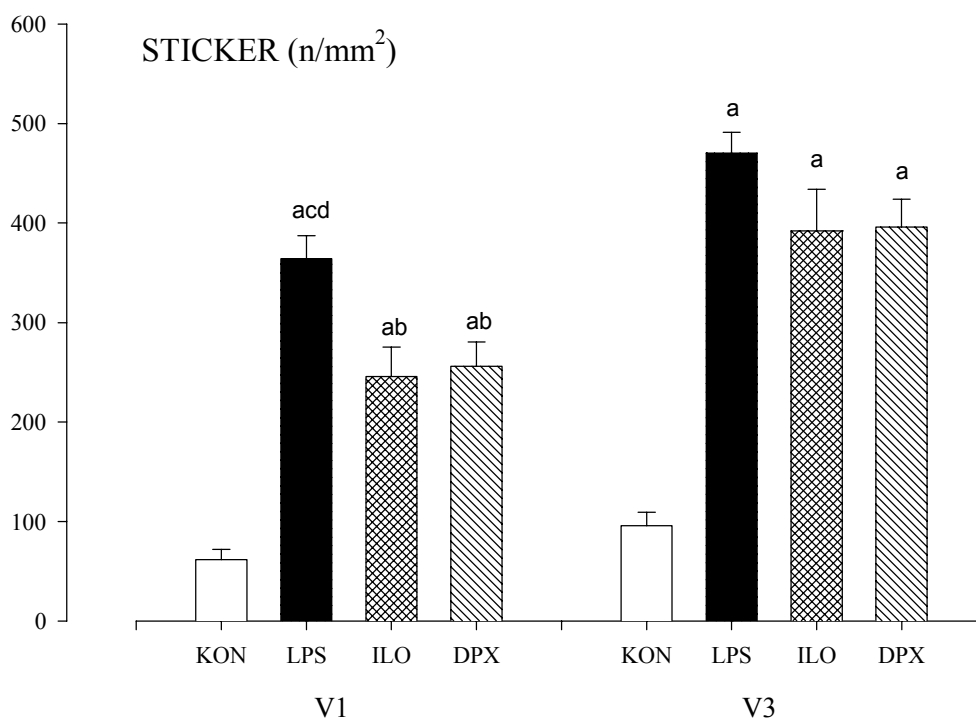


Abb. 56: 20 mg/kg KG LPS – Anzahl stickender Leukozyten in Venolen 1. und 3. Grades; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je $n = 10$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe, ^c $p < 0.05$ vs. Iloprost-Gruppe, ^d $p < 0.05$ vs. Dopexamin-Gruppe

5.2.2.3 Funktionelle Kapillardichte

Mukosa und Muskularis

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Eine Endotoxin-Belastung mit 5 mg/kg KG LPS führte zu keiner Störung der funktionellen Kapillardichte in der intestinalen Mukosa im gewählten Beobachtungszeitraum (Abb. 50). Bei Zugabe von Iloprost kam es jedoch zu einer signifikanten Zunahme der funktionellen Kapillardichte auf $632 \pm 50 \text{ cm}^{-1}$ (+ 20 %) im Vergleich zur Kontroll- und LPS-Gruppe ($p < 0.05$). Unter Dopexamin-Therapie erreichte die FCD-Zunahme keine statistische Signifikanz (+ 11 %).

In der longitudinalen Muskularis-Schicht fanden wir keine signifikanten FCD-Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen (Abb. 51). In der zirkulären Dünndarmmuskulatur beobachteten wir im Gegensatz zur mukosalen FCD-Zunahme bei Iloprostgabe eine Reduktion der funktionellen Kapillardichte um 30% auf $179 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ ($p < 0.05$ vs. Kontroll-, LPS- und Dopexamin-Gruppe).

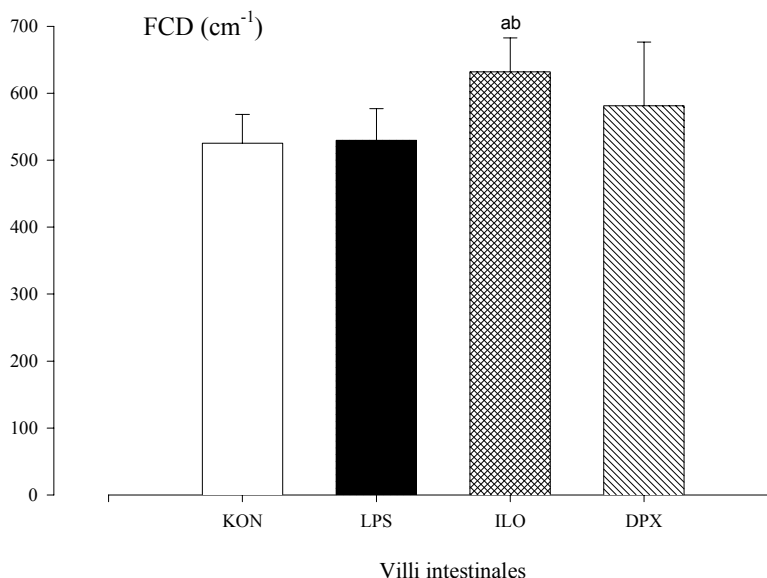


Abb. 57: 5 mg/kg KG LPS - Funktionelle Kapillardichte (FCD; cm^{-1}) der Villi intestinales; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je $n = 10$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe

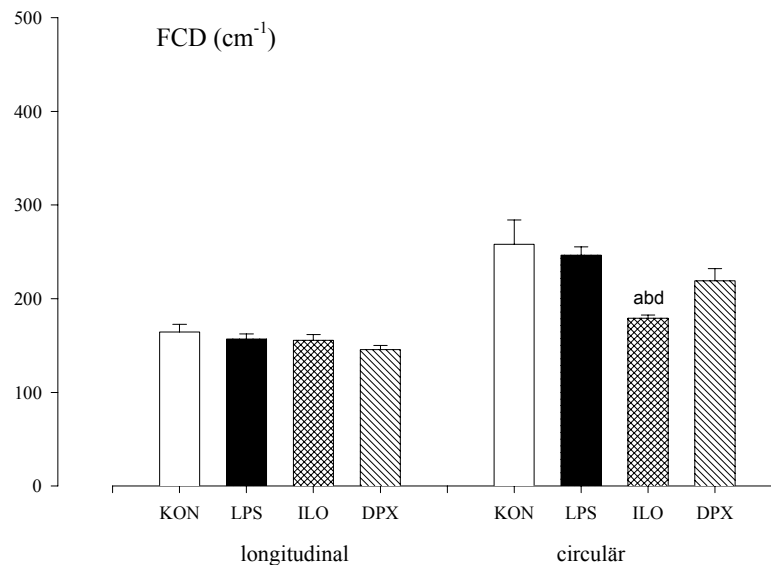


Abb. 58: 5 mg/kg KG LPS - Funktionelle Kapillardichte (FCD; cm^{-1}) der longitudinalen und circulären Dünndarmmuskulatur; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je $n = 10$); ^a $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^b $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe, ^d $p < 0.05$ vs. Dopexamin-Gruppe

Mukosa und Muskularis

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

In der Versuchsreihe mit erhöhter Endotoxin-Belastung (20 mg/kg KG LPS) kam es zu den im Teil 1 bereits beschriebenen Störungen der funktionellen Kapillardichte in der Muskularis, wohingegen in der Mukosa die FCD stabil blieb (Abb. 53). Wiederum war eine leichte FCD-Steigerung in der Mukosa bei Iloprost-Therapie zu verzeichnen (+ 17 %; $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe). Der korrespondierende FCD-Rückgang in der zirkulären Muskularis blieb jedoch aus. Im Bereich der Muskularis konnte durch die Applikation von Dopexamin die FCD signifikant verbessert werden (longitudinal: + 33 %, zirkulär: + 48 %; $p < 0.05$ vs. LPS-Gruppe).

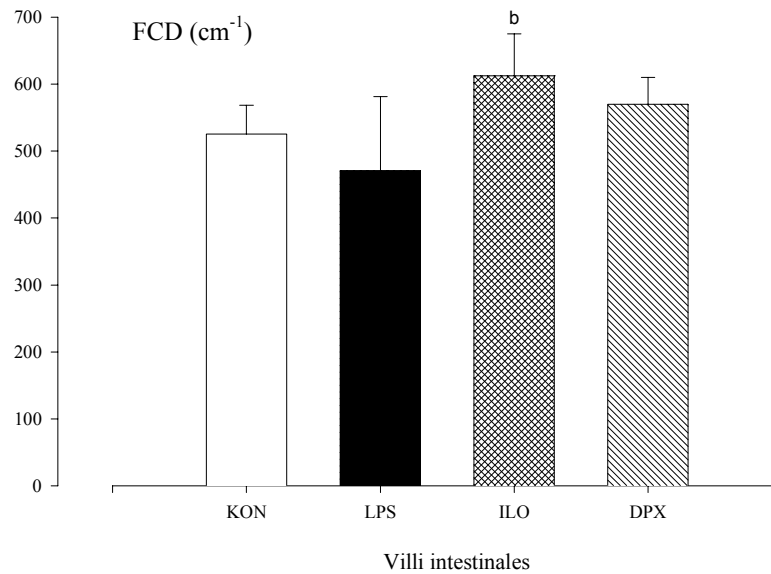


Abb. 59: 20 mg/kg KG LPS - Funktionelle Kapillardichte (FCD; cm⁻¹) der Villi intestinales; Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je n = 10); ^b p<0.05 vs. LPS-Gruppe

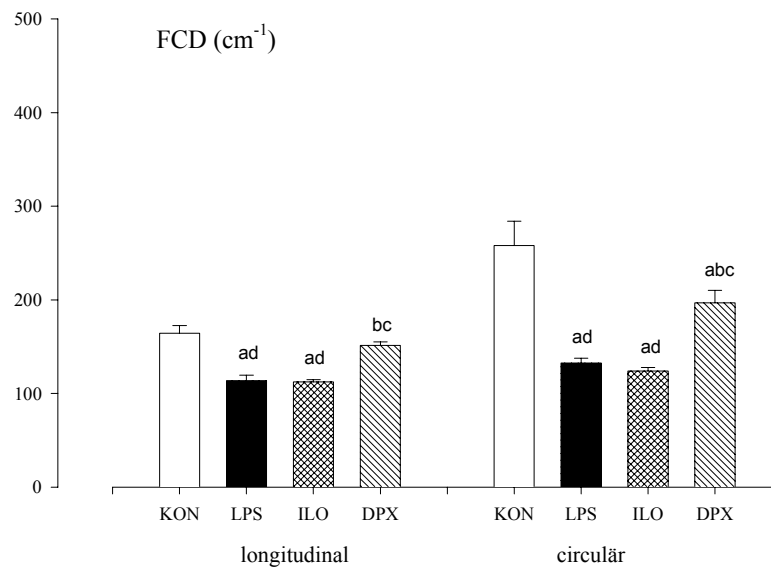


Abb. 60: 20 mg/kg KG LPS - FCD der longitudinalen und circulären Dünndarmmuskulatur (cm⁻¹); Mittelwert \pm SEM; KON = Kontrollgruppe, LPS = LPS-Gruppe, ILO = Iloprost-Gruppe, DPX = Dopexamin-Gruppe (je n = 10); ^a p<0.05 vs. Kontrollgruppe, ^b p<0.05 vs. LPS-Gruppe, ^c p<0.05 vs. Iloprost-Gruppe, ^d p<0.05 vs. Dopexamin-Gruppe

5.2.3 Tumornekrosefaktor- α

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Die operative Präparation führte zu keiner TNF- α -Freisetzung (0 h-Wert). Ein signifikanter TNF- α -Anstieg zeigte sich in allen Gruppen nach Induktion der Endotoxinämie. Der Anstieg der TNF- α -Konzentration zwei Stunden nach LPS-Applikation lag in der unbehandelten LPS-Gruppe im Vergleich zu den mit Iloprost bzw. Dopexamin behandelten Versuchsgruppen signifikant höher (4041 ± 871 pg/ml vs. 1709 ± 137 pg/ml [- 57 %] bzw. 1559 ± 282 pg/ml [- 61 %]; $p < 0.05$). Alle Gruppen mit LPS-Applikation zeigten zum Zeitpunkt 4 h einen Rückgang der TNF- α -Werte. Vier Stunden nach Endotoxin-Applikation war der TNF- α -Wert der LPS-Gruppe jedoch noch signifikant gegenüber den anderen Gruppen erhöht.

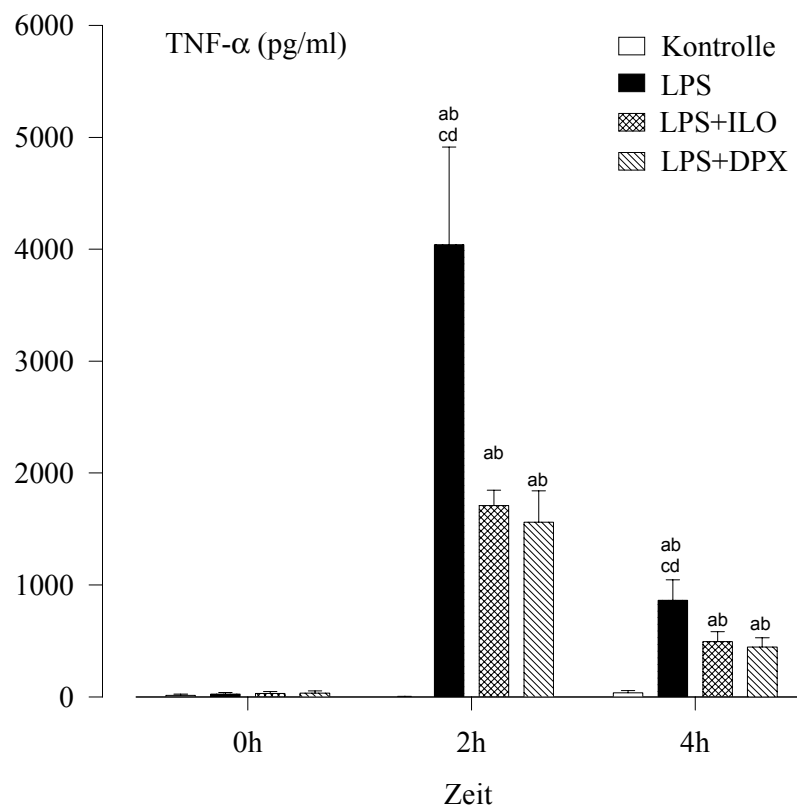


Abb. 61: 5 mg/kg KG LPS - Tumornekrosefaktor- α (TNF- α); Mittelwert \pm SEM; n = 20;
^a $p < 0.05$ vs. Ausgangswert, ^b $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^c $p < 0.05$ vs. LPS+ILO, ^d $p < 0.05$ vs. LPS+DPX

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Da im Teil 1 der Studie bei Belastung mit 20 mg/kg KG LPS der TNF- α -Wert nach zwei Stunden niedriger lag, als bei Belastung mit 5 mg/kg KG LPS, untersuchten wir im 2. Teil der Studie zusätzlich den 1 h-Wert. Wir fanden einen zur niedrigeren Endotoxin-Belastung vergleichbaren TNF- α -Peak zu diesem Zeitpunkt (3637 ± 553 pg/ml), so dass sich die Annahme bestätigte, dass bei höherer Endotoxin-Belastung die maximale TNF- α -Freisetzung früher eintritt. Es zeigte sich wiederum eine signifikante Reduktion der TNF- α -Spitzenspiegel durch die Gabe von Iloprost (2311 ± 69 pg/ml [- 36 %]) bzw. Dopexamin (1933 ± 201 pg/ml [- 47 %]). Im weiteren Verlauf waren die TNF- α -Werte rückläufig, lagen nach vier Stunden Beobachtungszeit jedoch noch signifikant über dem Wert der Kontrollgruppe und dem Ausgangswert ($p < 0.05$).

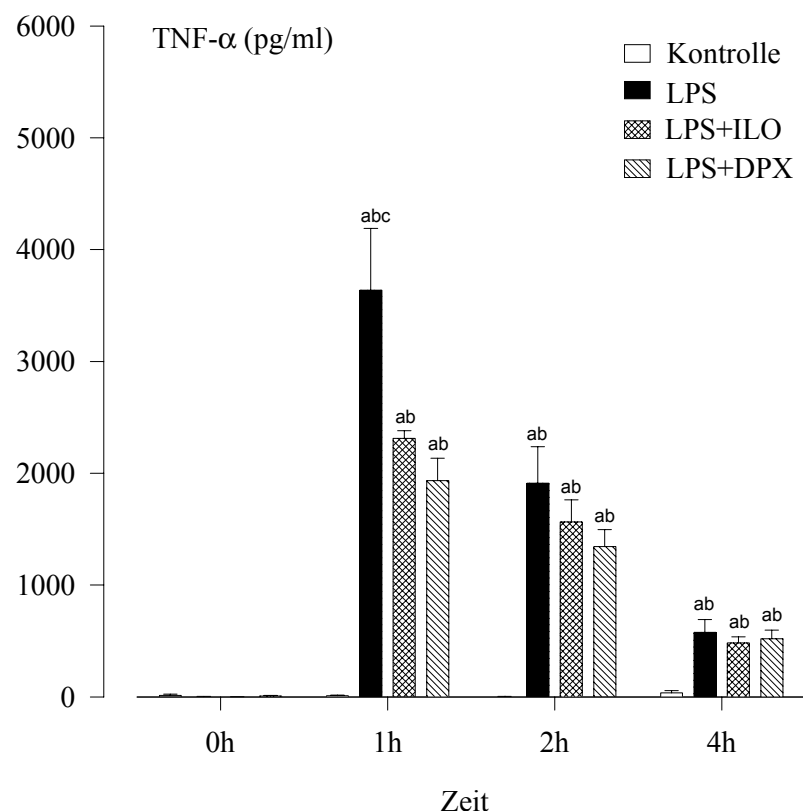


Abb. 62: 20 mg/kg KG LPS - Tumornekrosefaktor- α (TNF α); Mittelwert \pm SEM; n = 20; ^a $p < 0.05$ vs. Ausgangswert, ^b $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, ^c $p < 0.05$ vs. LPS+ILO, ^d $p < 0.05$ vs. LPS+DPX

5.2.4 Intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Mittels der Laser-Doppler-Flowmetrie deckten wir einen signifikanten Rückgang des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses (IMBF) nach Gabe von 5 mg/kg KG LPS auf. Nach zwei Stunden Endotoxinämie fiel der IMBF in der unbehandelten LPS-Gruppe auf 72% des Ausgangswertes ab ($p < 0.05$).

Nach vier Stunden betrug der IMBF noch 62 % vom Ausgangswert. Damit bestand ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der sich der IMBF über den gesamten Versuchszeitraum nur um 16 % (Zeitpunkt 2h) bis 20 % (Zeitpunkt 4h) verringerte.

Eine Therapie mit vasoaktiven Substanzen (Iloprost, Dopexamin) konnte die IMBF-Reduktion unter Endotoxinämie vermindern. Zum Zeitpunkt 4 h unterschieden sich die Werte nicht von denen der Kontroll-Gruppe.

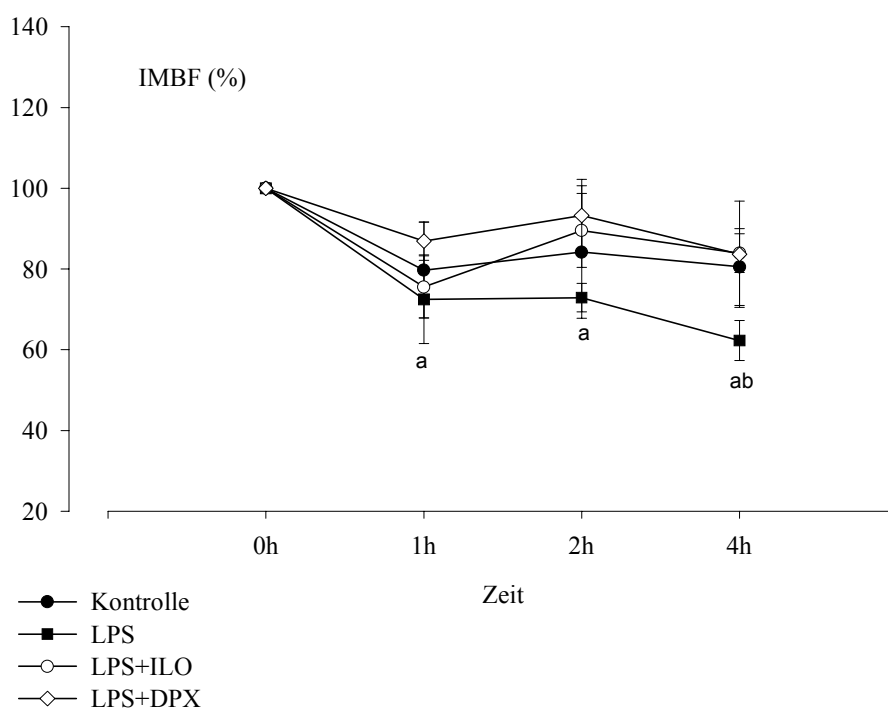


Abb. 63: 5 mg/kg KG LPS – IMBF; Mittelwert \pm SEM; $n = 10$; ^a $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^b $p < 0.05$ vs. LPS vs. Kontrollgruppe

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Bei höherer Endotoxin-Belastung kam es zu einer weiteren Reduktion des IMBF in der unbehandelten LPS-Gruppe. Nach einer Stunde Endotoxinämie wurde ein IMBF-Rückgang auf 51 % vom Ausgangswert registriert.

Nach vier Stunden betrug der IMBF 41 % vom Ausgangswert. Die Werte unterschieden sich zu allen Messzeitpunkten signifikant von der Kontrollgruppe und den mit Iloprost bzw. Dopexamin behandelten Gruppen ($p < 0.05$).

Die mit Dopexamin therapierten Tiere wiesen über den gesamten Beobachtungszeitraum die höchsten IMBF-Werte auf (über den Werten der Kontroll-Gruppe). Zwischen der Kontroll-Gruppe und den mit vasoaktiven Substanzen behandelten Endotoxinämie-Gruppen bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

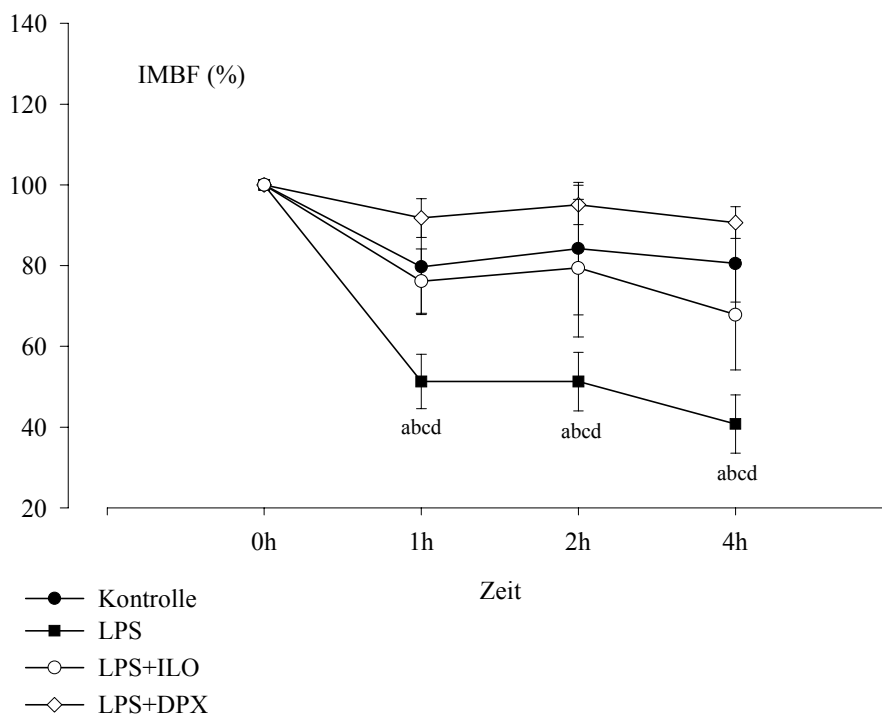


Abb. 64: 20 mg/kg KG LPS – IMBF; Mittelwert \pm SEM; $n = 10$; ^a $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^b $p < 0.05$ LPS vs. Kontroll-Gruppe, ^c $p < 0.05$ LPS vs. LPS-DPX, ^d $p < 0.05$ LPS-ILO vs. LPS-ILO 0h

5.2.5 Powerspektralanalyse

5.2.5.1 RR-Spektren

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Im LF-Bereich der RR-Spektren zeigten sich bei einer Belastung mit 5 mg/kg KG LPS keine signifikanten Veränderungen. Es fällt jedoch auf, dass in allen LPS-belasteten Gruppen ein höheres Niveau der LF-Power gemessen wird. Im HF-Bereich fanden wir bei einer Endotoxinämie mit 5 mg/kg LPS konstante Verläufe über den Versuchszeitraum.

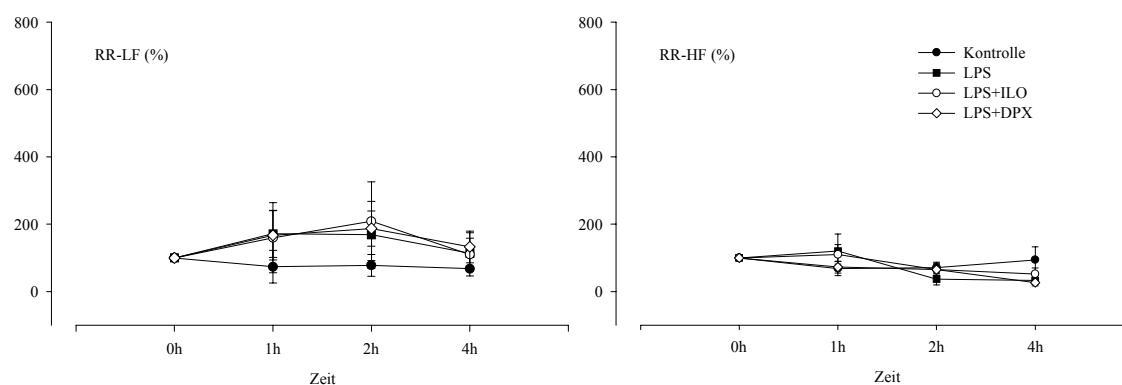


Abb. 65: 5 mg/kg KG LPS – RR-Powerspektralanalyse, LF- und HF-Power; Mittelwert \pm SEM, n = 10, prozentuale Veränderungen über die Zeit (Zeitpunkt 0 h = 100 %)

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Bei einer Belastung mit 20 mg/kg KG LPS fanden wir in der unbehandelten LPS-Gruppe einen signifikanten Anstieg der LF-Power zum Zeitpunkt 2 h ($464 \pm 68\%$ v. Ausgangswert; $p < 0.05$). Der Anstieg der LF-Power in den behandelten Gruppen war nicht signifikant. Zum Zeitpunkt 4 h befand sich die LF-Power in allen Gruppen wieder auf dem Ausgangsniveau. Die HF-Power zeigt auch bei höherer Endotoxinbelastung keine signifikanten Veränderungen über den Beobachtungszeitraum (Abbildung 68).

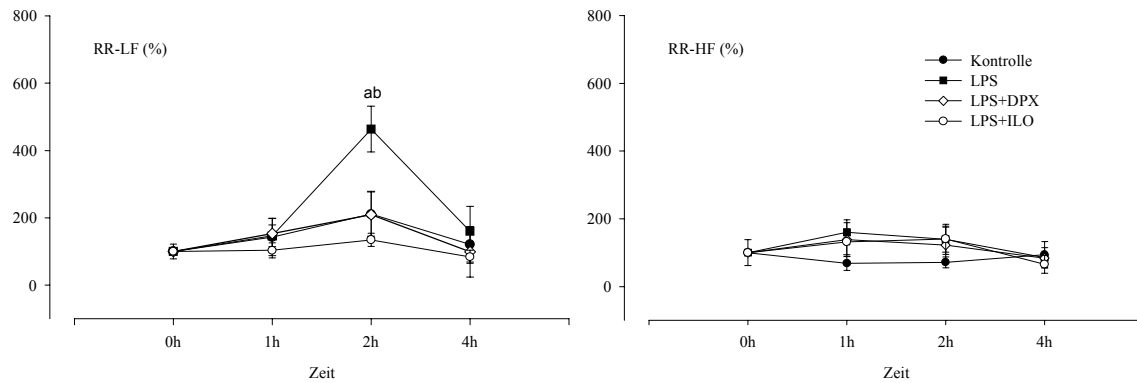


Abb. 66: 20 mg/kg KG LPS – RR-Powerspektralanalyse, LF- und HF-Power; Mittelwert \pm SEM, $n = 10$, prozentuale Veränderungen über die Zeit (Zeitpunkt 0 h = 100 %); ^a $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^b $p < 0.05$ LPS vs. Kontroll-Gruppe

5.2.5.2 IMBF-Spektren

Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS

Im LF-Bereich der IMBF-Spektren fanden wir bei einer Belastung mit 5 mg/kg KG LPS keine signifikanten Veränderungen. Ebenso registrierten wir im HF-Bereich der IMBF-Spektren bei einer Endotoxin-Belastung von 5 mg/kg KG LPS konstante Verläufe über den gesamten Beobachtungszeitraum.

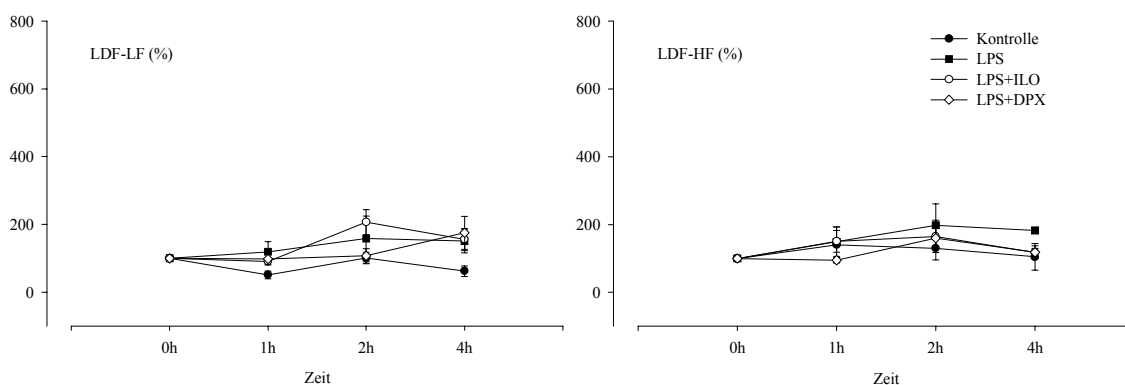


Abb. 67: 5 mg/kg KG LPS – IMBF-Powerspektralanalyse, LF- und HF-Power; Mittelwert \pm SEM, $n = 10$, prozentuale Veränderungen über die Zeit (Zeitpunkt 0 h = 100 %)

Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS

Bei einer Belastung mit 20 mg/kg KG LPS fanden wir in der unbehandelten LPS-Gruppe analog zu den RR-Spektren einen signifikanten Anstieg der LF-Power zum Zeitpunkt 2 h im IMBF-Spektrum (337 ± 106 % v. Ausgangswert; $p < 0.05$). Bei zusätzlicher Gabe von Iloprost bzw. Dopexamin blieb dieser Anstieg aus. Die HF-Power der IMBF-Spektren zeigte bei Belastung mit 20 mg/kg KG LPS keine Veränderungen über den Beobachtungszeitraum.

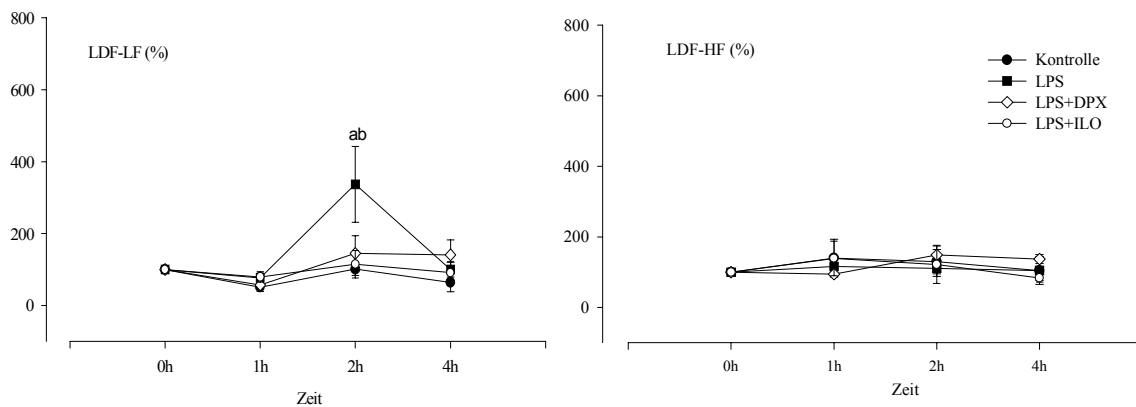


Abb. 68: 20 mg/kg KG LPS – IMBF-Powerspektralanalyse, LF- und HF-Power; Mittelwert \pm SEM, $n = 10$, prozentuale Veränderungen über die Zeit (Zeitpunkt 0 h = 100 %); ^a $p < 0.05$ LPS vs. LPS 0h, ^b $p < 0.05$ LPS vs. Kontroll-Gruppe

6 Diskussion

Die Störung der intestinalen Mikrozirkulation wird als ein kardinaler Mechanismus für die Entwicklung des Multiorganversagens im Rahmen von Systemischen Inflammationssyndrom (SIRS) und Sepsis angesehen.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss verschiedener, potentiell protektiver Substanzen auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung im Tiermodell zu evaluieren.

Im Studienkonzept wurden zwei therapeutische Optionen verfolgt. Zum einen wurde eine Behandlung mit antioxidativen Substanzen und zum anderen die Gabe von vasoaktiven Medikamenten bei verschieden starker Endotoxinbelastung untersucht.

Im folgenden werden die einzelnen Ergebnisse der Arbeit im Zusammenhang der beiden Teilstudien und im Literaturvergleich diskutiert.

6.1 Hämodynamik

6.1.1 Hämodynamische Veränderungen bei experimenteller Endotoxinämie

Obwohl gemäß den Definitionen von SIRS, Sepsis und septischem Schock [33] hämodynamische Veränderungen pathognomonisch für den Krankheitsverlauf sind, stellen wissenschaftliche Untersuchungen von Mikrozirkulationsprozessen besondere Anforderungen an das hämodynamische Profil eines Studiendesigns. Für die Evaluation Endotoxin-spezifischer Veränderungen in der Endstrombahn sollte eine klare Abgrenzung zum Einfluss makrohämodynamischer Veränderungen (systemische Hypotension) auf die Mikrozirkulation möglich sein [9; 205].

Eine Bewertung von Vorgängen in der mikrozirkulatorischen Endstrombahn, wie z.B. der Leukozytenadhärenz, ist abhängig vom arteriellen Mitteldruck. Der MAP beeinflusst die Blutflussgeschwindigkeit. Die Blutflussgeschwindigkeit determiniert nach der Newtonschen Formel die Scherkräfte, welche maßgeblich die Leukozytenadhärenz modulieren [87; 208].

In verschiedenen Studiendesigns wird die hämodynamische Insuffizienz durch

zusätzliche Maßnahmen (z.B. Hämorrhagie, Herzbeuteltamponade) verstärkt, um bestimmte klinische Situationen zu modellieren und therapeutische Prinzipien zu validieren [327; 328].

Da in unseren Untersuchungen Endotoxin-spezifische Veränderungen der intestinalen Mikrozirkulation im Vordergrund standen, wählten wir ein Studiendesign, in dem durch eine limitierte Endotoxin-Dosierung und adäquate Volumensubstitution ein normotensiver Zustand der Versuchstiere aufrechterhalten werden konnte. Die notwendige Volumensubstitutionsrate wurde in Vorversuchen ermittelt. Zielparameter dabei waren Blutdruck- und Hämatokritstabilität.

Der Ausgangswert des arteriellen Mitteldrucks der Versuchstiere lag bei 110 mmHg. Im vierstündigen Versuchsablauf wurde ein durchschnittlicher MAP von 100 mmHg gemessen.

Die intravenöse Infusion von 5 mg/kg KG Lipopolysaccharid führte zu einem kurzzeitigen Blutdruckabfall innerhalb der ersten halben Stunde. Der arterielle Mitteldruck lag in dieser Phase nicht unter 80 mmHg. Bereits nach einer Stunde unterschied sich der MAP in der LPS-Gruppe nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe und dem Ausgangswert. Insbesondere zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie unterschieden sich die Versuchstiere bezüglich der Makrohämodynamik nicht.

Die gleiche Aussage kann für die Versuchsreihen mit Gabe von 20 mg/kg KG LPS getroffen werden. Die Blutdruckwerte nach Endotoxin-Exposition lagen gering unter denen der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. Nach einer Stunde Beobachtungszeit ließen sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe nachweisen.

Das Herzfrequenzverhalten war bei allen Tieren, die mit Endotoxin belastet wurden, gleichartig durch eine Tachykardie gekennzeichnet. Nach einer Stunde Endotoxinämie stieg die Herzfrequenz von initial 350 Schlägen pro Minute auf Werte um 400 Schläge pro Minute an. Im weiteren Verlauf blieb die Herzfrequenz auf erhöhtem Niveau. Die Herzfrequenz in der Kontrollgruppe war dagegen während des gesamten Beobachtungszeitraumes stabil.

Die bei der Applikation von Bakterienprodukten typischen makrohämo-dynamischen Veränderungen sind von der Art des Toxins, der Dosis, der Applikationsform, der gewählten Tierspezies und von der Interaktion mit anderen kreislaufwirksamen Substanzen abhängig. Sie umfassen eine transiente oder persistierende Hypotonie und Tachykardie [91; 235]. Bei

mangelnder Volumensubstitution werden diese Veränderungen verstärkt [138; 235].

Die Art des Toxins wird bei i.v.-Infusionsmodellen (im Gegensatz z.B. zum Zökalligatur- und Punktionsmodell) durch den Untersucher ausgewählt. Somit können Studien miteinander vergleichbar angelegt werden. Zwischen einzelnen Chargen desselben Serotyps Endotoxin können jedoch Wirkunterschiede auftreten [62]. Trotz gleichartigen Endotoxin-Typs müssen Dosisangaben daher vorsichtig bewertet werden. Wir verwendeten für alle Versuche dieselbe Charge Endotoxin (Lipopolysaccharid von *E. coli*, Serotyp O55:B5). Wir wählten den Serotyp nach umfangreichen Recherchen in der Literatur aus [40; 164; 201; 230; 265; 298; 321; 327]. Ein weiterer, häufig verwendeter Serotyp des *E. coli*-Endotoxins ist O111:B4 [88; 123; 207; 246; 284]. Wichtigste „Nichtendotoxin-Toxine“ sind das α -Toxin von *Staphylococcus aureus* (Hämolysin; Porenbildner), das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (ADP-ribosylierendes Toxin) und die Staphylokokkoken-Enterotoxine A-E (sogenannte Superantigene; [39; 109; 264].

Bei LPS-Dosen in der von uns verwendeten Größenordnung ist ein transientser Blutdruckabfall charakteristisch [14; 205; 238; 321]. Regelmäßig persistiert in den mitteldosierten LPS-Modellen aber die Erhöhung der Herzfrequenz nach LPS-Applikation, was auch in unserem Versuchsmodell zu beobachten war [14; 321]. Nur bei LPS-Dosen < 1 mg/kg KG kann eine Tachykardie ausbleiben [254].

Xu et al. beschrieben in einem - unserer Versuchsanordnung sehr ähnlichen - Endotoxin-Modell (Tierspezies Ratte, 5 mg/kg KG Endotoxin von *E. coli* O55:B5) einen unveränderten MAP bei Anstieg der Herzfrequenz [321]. In diesem Versuchsmodell registrierten die Autoren eine Stunde nach Induktion der Endotoxinämie ein erhöhtes Herzminutenvolumen. Somit konnten sie zeigen, dass ein hyperdynamisches Modell der Endotoxinämie vorlag. Auf Grund der starken Ähnlichkeit unseres Modells und des von *Xu et al.* kann auch bei unserem Modell ein hyperdynamisches Kreislaufverhalten angenommen werden.

Für die hämodynamische Situation bei Endotoxinämie im Tierexperiment ist die Art der Endotoxinapplikation entscheidend. Appliziert man bei der Ratte höhere Dosen Endotoxin (bis 40 mg/kg KG) in Bolusform, kommt es in der Regel zu einer hypodynamen Kreislaufsituation [42; 168]. Bei geringeren Bolusdosen findet man initial eine hyperdynamische Situation, die erst später (> 4 h) in eine hypodynamische Phase umschlägt [254]. Auch die kontinuierliche Endotoxin-Applikation löst eine hyperdynamische Kreislaufsituation aus [80;

144]. Wir wählten eine LPS-Kurzinfusion um einerseits die Nachteile der Bolusinjektion zu vermeiden und andererseits eine zeitlich definierte Schädigung zu setzen.

Die Veränderungen von Herzfrequenz und mittlerem arteriellen Blutdruck dienen in vielen Studien, die LPS verwenden, als Effektivitätskriterium der Endotoxinämie. Insbesondere die toxische LPS-Wirksamkeit kann anhand dieser beiden Parameter beurteilt werden. Eine Kontrolle des Wirkungseintritts kann schon kurze Zeit nach Applikation des Endotoxins anhand des temporären Blutdruckabfalls vorgenommen werden [141; 255]. Andererseits kann der modulierende Effekt von Pharmaka auf die septische Hämodynamik validiert werden.

Die notwendige Dosis für die Erzielung hämodynamischer Veränderungen hängt von der gewählten Tierspezies ab. So sind Ratten um den Faktor 100-1000 resistenter gegenüber Endotoxin als Primaten, Hunde, Katzen, Schweine und Kaninchen [78; 234; 316]. Der Mensch reagiert extrem sensibel auf geringe Dosen von Endotoxin. *Suffredini* et al. konnten an Freiwilligen mit einer Dosis von 4 ng/kg KG Endotoxin (O113) eine Tachykardie, Hypotonie und eine hyperdynamie Kreislauftsituation auslösen [287]. Auch *Revhaug* et al. fanden Sepsis-typische Veränderungen in diesem Dosisbereich beim Menschen [242].

Die Pathogenese der septischen Kreislaufinsuffizienz ist multifaktoriell und - obwohl es bereits verschiedene therapeutische Ansätze gibt - noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Man unterscheidet die septische Kardiomyopathie von Veränderungen im Sinne einer komplexen Vaskulopathie.

Verschiedene Sepsismediatoren besitzen kardiodepressive Eigenschaften. So werden u.a. Endotoxine, Exotoxine, Tumornekrosefaktor- α , Interleukin 1, Stickoxid und reaktive Sauerstoffverbindungen in Verbindung mit der akuten septischen Kardiomyopathie gebracht [264]. Die resultierende Pumpfunktionseinschränkung gilt als pathogenetisch bedeutsamste Komponente dieser spezifischen Form der Herzinsuffizienz.

Zu Beginn des septischen Geschehens findet man häufig eine normotensive, hyperdynamie Kreislauftsituation mit erniedrigten peripheren Widerständen [31]. Hier wird der grundlegende Unterschied zum kardiogenen Schock deutlich. Die schwere Sepsis und der septische Schock sind durch eine behandlungspflichtige Hypotension bei meist hyperdynamer Kreislauflage charakterisiert [35]. Bei weiterer Progredienz oder foudroyanten Verläufen kann eine hypodynamie Kreislauftsituation auftreten [264].

Die Veränderungen in der Mikrozirkulation sind durch eine pathologische Vasodilatation in Kombination mit Gebieten einer inadäquaten Vasokonstriktion

gekennzeichnet. Vasodilatatorisch wirkende Sepsismediatoren sind z.B. Tumornekrosefaktor- α , Interleukin 1, Histamin, Stickstoffmonoxid und Prostaglandin I_2 [128; 223]. Vasokonstriktorisch wirken u.a. Noradrenalin, Vasopressin, Endotheline, Leukotriene und Thromboxan A_2 [37; 79; 93]. Hinzu kommt eine gestörte Ansprechbarkeit adrenerger Rezeptoren und eine autonome Dysfunktion. Endresultat der Maldistribution in der Mikrozirkulation ist die Minderperfusion und Dysfunktion multipler Organe.

6.1.2 Einfluss der untersuchten Substanzen

Der Einfluss der untersuchten Substanzen auf die Hämodynamik in unserem Versuchsmodell ist vor dem Hintergrund des für die Intravitalmikroskopie angestrebten Erhalts normotensiver Kreislaufverhältnisse auch in den unbehandelten LPS-Gruppen zu bewerten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden antioxidative Substanzen evaluiert. Im Gegensatz zu den primär vasoaktiven Substanzen aus Teil 2 der Studie war ein direkter Effekt auf die Hämodynamik nicht zu erwarten. Im Rahmen der Beeinflussung des Gesamtbildes bei Endotoxinämie, d.h. der Reduktion mediatorbedingter Veränderungen, konnte jedoch mit indirekten hämodynamischen Effekten gerechnet werden.

In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS wurde der initiale, geringe MAP-Abfall durch die eingesetzten Therapeutika nicht signifikant beeinflusst, wenn auch bei Lazaroid-Behandlung die höchsten Blutdruckwerte gemessen wurden. Im weiteren Verlauf fanden wir keine Unterschiede zwischen den Behandlungs- und Kontrollgruppen. Ebenso unbeeinflusst war die Tachykardie nach Endotoxin-Applikation. Bei Applikation von 20 mg/kg KG LPS sahen wir hingegen eine signifikante Abschwächung der initialen MAP-Reduktion durch die Gabe von Oxypurinol bzw. des Aminosteroids U-74389G. Möglicherweise demaskierte sich der kreislaufprotektive Effekt der Antioxidantien erst durch den stärkeren MAP-Rückgang bei Belastung mit 20 mg/kg KG LPS. Auffällig in dieser Versuchsreihe war die Akzentuierung der Tachykardie durch U-74389G.

In vergleichbaren Endotoxin-Studien konnte mit Antioxidantien wie SOD, Allopurinol, reduziertem Glutathion und α -Tokopherol kein Einfluss auf die MAP-

Erniedrigung und die erhöhte Herzfrequenz genommen werden [8; 201; 314]. Die Kombination von α -Tokopherol und BW 755c (Inhibitor des Cyclooxygenase- und Lipoxygenaseweges) war jedoch in der Lage, den Blutdruckabfall zu verzögern [201]. *Zhang et al.* demonstrierten an endotoxämischen Hunden eine positive Wirkung des 21-Aminosteroids Tirilazad-Mesylat auf den MAP und andere hämodynamische Parameter wie Herzindex und pulmonalen Gefäßwiderstand. Neben einer vergleichsweise hohen Endotoxin-Dosis wurden zusätzlich alle Tiere splenektomiert (Verhinderung einer Hypotonie-induzierten Autotransfusion) und erhielten intraperikardiale Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung (zusätzliche Belastung der Herzfunktion durch Herzbeuteltamponade). Dadurch besitzt das von diesen Autoren verwendete Endotoxin-Modell möglicherweise eine höhere Sensitivität und war deshalb in der Lage, einen günstigen Effekt des 21-Aminosteroids auf den MAP nachzuweisen [327]. Der Erfolg dieser Therapie stützt die These der Mediatorrolle reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der akuten septischen Kardiomyopathie und Vaskulopathie.

Im zweiten Teil der Untersuchung setzten wir das stabile Prostacyclinanalogon Iloprost und das synthetische Katecholamin Dopexamin ein. Beide Substanzen können eine Vasodilatation hervorrufen. Die Dosis wurde daher im unteren therapeutischen Bereich gewählt (2 ng/kg/min Iloprost; 0,5 μ g/kg/min Dopexamin), um eine zusätzliche Hypotension zu vermeiden.

So beobachteten wir nach Gabe von 5 mg/kg KG LPS keine Verstärkung des Blutdruckabfalls, sondern sogar eine signifikante Kreislaufprotektion. Der mittlere arterielle Blutdruck in beiden Behandlungsgruppen lag signifikant über dem MAP der unbehandelten LPS-Gruppe. Auch die Tachykardie konnte reduziert werden. Dies ist besonders für Dopexamin überraschend, da die Tachykardie eine häufige Nebenwirkung beim Einsatz des Medikaments in der Klinik darstellt.

Bei Gabe von 20 mg/kg KG LPS war der protektive Effekt während des initialen Blutdruckabfalls nicht aufrechtzuerhalten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe. Im weiteren Verlauf unterschieden sich - wie angestrebt - die Behandlungsgruppen und die unbehandelte LPS-Gruppe weder im MAP noch in der Herzfrequenz signifikant voneinander.

Smith et al. [270] untersuchten den Einfluss von Iloprost auf hämodynamische und metabolische Veränderungen bei experimenteller Endotoxinämie. Analog zu unseren Ergebnissen fand die Arbeitsgruppe keine negative Beeinflussung des MAP-Verlaufes über

einen Beobachtungszeitraum von drei Stunden.

Manasia et al. [189] zeigten in einem Endotoxin-Modell am Schwein, dass bei fehlendem Einfluss auf den systemischen Blutdruck und das Herzzeitvolumen die Iloprost-Behandlung in der Lage war, den intestinalen Blutfluss zu steigern.

Dopexamin besitzt im Vergleich zum Dopamin eine 60fach stärkere Wirkung am β_2 -Rezeptor und ein Drittel der Wirksamkeit am DA_1 -Rezeptor [44]. Der prinzipielle Unterschied zum Dopamin ist die fehlende Aktion am α_1 - und α_2 -Rezeptor. Damit dominiert die vasodilatierende Wirkung bei gering ausgeprägter positiv inotroper Wirkung (β_1). Das hämodynamische Profil prädestiniert die Substanz für den Einsatz in der Herzinsuffizienz. Aber auch im Kontext der Sepsis erscheint die Anwendung indiziert.

Bei Patienten im septische Schock steigerte Dopexamin in einer Dosis von 1-6 $\mu\text{g/kg/min}$ signifikant das Herzzeitvolumen. Der mittlere arterielle Druck änderte sich nicht signifikant. Der systemische Widerstand sank dagegen ab [264].

Schmidt et al. [258] setzten Dopexamin in höherer Dosierung (2,5 $\mu\text{g/kg/min}$) bei experimenteller Endotoxinämie im Rattenmodell ein und beschrieben stabile Kreislaufverhältnisse. Sie konnten eine signifikant verbesserte Mikrozirkulation am Darm nachweisen.

6.2 Laborparameter

6.2.1 Blutgasanalyse

Der Respirationstrakt unterliegt - ebenso wie das Kreislaufsystem - vielfältigen Beeinträchtigungen bei Endotoxinämie und Sepsis. Die akute respiratorische Insuffizienz ist die häufigste Komponente des Multiorganversagens [264].

Als frühes klinisches Zeichen hat die Tachypnoe bzw. Hypokapnie Eingang in die Sepsisdefinition gefunden [35]. In der Folge treten Störungen der Sauerstoffaufnahme mit Hypoxämie auf; die Totraumventilation ist erhöht, die Compliance der Lunge erniedrigt und die Atemarbeit steigt erheblich an.

Für das akute Lungenversagen wird eine inflammatorische Reaktion des

Lungengewebes im Zusammenhang mit körpereigenen Entzündungszellen und ihren Mediatoren verantwortlich gemacht [292]. Dabei ist es sekundär, ob die Entzündungsquelle pulmonal oder extrapulmonal (systemisch) lokalisiert ist.

Zudem ist die Lunge als regulativer Bestandteil im Säure-Basen-Haushalt des Körpers bei Endotoxinämie und Sepsis stark beansprucht. Infolge der häufig auftretenden metabolischen Azidose kommt es zu der oben beschriebenen Hyperventilation im Sinne eines respiratorischen Kompensationsmechanismus.

In unseren Experimenten beobachteten wir bei allen mit Endotoxin belasteten Tieren eine deutliche Tendenz zur Hypokapnie über den Versuchszeitraum. Nach Applikation von 5 mg/kg KG LPS waren die Veränderungen noch moderat. Lediglich unter Oxypurinoltherapie fanden wir nach vier Stunden signifikant gegenüber den Ausgangswerten erniedrigte $p\text{CO}_2$ -Werte.

Allerdings stellten wir auch in der Kontrollgruppe eine Hypokapnieentwicklung zu diesem Zeitpunkt fest, so dass die Endotoxingabe nicht als alleinige Ursache für die Hypokapnie zu sehen ist. Bei Gabe der höheren Endotoxindosis (20 mg/kg KG LPS) wurden jedoch bereits nach zwei Stunden signifikant niedrigere $p\text{CO}_2$ -Werte als in der Kontrollgruppe gemessen. Die Gabe der Testsubstanzen hatte keinen Einfluss auf die Hypokapnie.

Die pH-Werte waren in beiden Versuchsreihen bei allen Gruppen stabil. Offensichtlich gelang es den Versuchstieren mit der respiratorischen Kompensation eine systemische pH-Wertverschiebung bei zu erwartender metabolischer Azidose nach Endotoxingabe (siehe Laktatergebnisse) abzuwenden.

Oxygenierungsstörungen sahen wir in unserem experimentellen Modell nicht. Wir beobachteten im Gegenteil einen leichten, jedoch signifikanten Anstieg der $p\text{O}_2$ -Werte über den Versuchszeitraum, der lediglich in der unbehandelten LPS-Gruppe fehlte.

Den $p\text{O}_2$ -Anstieg sehen wir im Zusammenhang mit einer möglichen initialen Oxygenierungsstörung durch die Narkoseeinleitung mittels Etherrausch. Die initialen $p\text{O}_2$ -Werte lagen mit 10-12 kPa (75-90 mmHg) im unteren Normbereich. Nach vier Stunden befanden sich die Werte mit ca. 14 kPa (105 mmHg) im oberen Normbereich.

Der fehlende $p\text{O}_2$ -Anstieg in der unbehandelten LPS-Gruppe muss danach als

beginnende Störung der Lungenfunktion angesehen werden. *Vice versa* erscheint durch die Gabe der Testsubstanzen eine Protektion der Lungenfunktion erreicht worden zu sein, z.B. durch eine Reduktion der intrapulmonalen Leukozytenadhärenz. Bei den antioxidativen Substanzen bewirkte Oxypurinol im Vergleich zum Lazaroid U-74389G einen größeren Effekt auf die Oxygenierung (in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS als einzige Gruppe bereits nach zwei Stunden signifikante Verbesserung gegenüber dem Ausgangswert; höchster pO₂-Wert nach vier Stunden). Von den beiden untersuchten vasoaktiven Substanzen schnitt Dopexamin besser ab (in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS nach vier Stunden im Gegensatz zur Ilopostgruppe signifikant höherer pO₂ als LPS-Gruppe).

Bei Belastung mit 20 mg/kg KG LPS war der protektive Effekt der vasoaktiven Substanzen nur nach zwei Stunden signifikant. Bei Behandlung mit den Antioxidantien entwickelte sich die Signifikanz zum Zeitpunkt 4 h.

Die Ergebnisse der Blutgasanalysen entsprechen den Angaben vergleichbarer Studien mit spontanatmenden [254; 260] bzw. beatmeten [41; 205] Ratten bei Endotoxinämie. Eine Beatmungspflichtigkeit ergab sich in unserem Versuchsmodell nicht. Zur Sicherstellung freier Atemwege wurden die Tiere jedoch tracheotomiert und bei Bedarf abgesaugt.

6.2.2 Laktat

Erhöhte Laktatspiegel werden häufig bei Endotoxinämie und Sepsis gemessen. Hierbei wird eine Hyperlaktatämie (2-5 mmol/l) von einer Laktatazidose (>5mmol/l) unterschieden. In klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass hohe Laktatspiegel mit einer erhöhten Mortalität korrelieren [51; 305]. Die Laktatazidose hat als fakultatives Symptom Eingang in die Definition der schweren Sepsis und des septischen Schocks gefunden [35].

Wir fanden bei den Versuchstieren, die Endotoxin erhalten hatten, bereits nach zwei Stunden einen signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration im Blut. Nach vier Stunden waren in der unbehandelten LPS-Gruppe bei Gabe von 5 mg/kg KG LPS Laktatwerte um 3,5 mmol/l erreicht. Bei Applikation von 20 mg/kg KG LPS wurden Werte um 4,5 mmol/l gemessen. Dies entspricht nach den obengenannten Kriterien einer Hyperlaktatämie.

In einer Studie von *Hargrove et al.* wurden bei Belastung mit 1 mg/kg KG LPS (*E. coli* O26:B6) nach vier Stunden Laktatkonzentrationen von durchschnittlich 3,5 mmol/l gemessen [120]. *Van Lambalgen et al.* sahen bei Applikation von 20 mg/kg KG LPS (*E. coli* O127:B7) einen Laktatanstieg auf $4,4 \pm 0,3$ mmol/l [301].

Im ersten Teil der Studie fanden wir unter Lazaroid-Therapie in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS eine signifikante Reduktion des Laktatanstiegs. Nach zwei Stunden Endotoxinämie war der Laktatwert noch unverändert. Nach vier Stunden lag der Wert signifikant unter denen der unbehandelten und der mit Oxypurinol behandelten LPS-Gruppe. *Zhang et al.* konnten in einem feline Modell durch den Einsatz eines Aminosteroids ebenso den Endotoxin-induzierten Laktatanstieg verhindern [327].

In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS und in beiden Versuchsreihen des zweiten Teils der Arbeit (vasoaktive Substanzen) konnten wir keinen Effekt auf die Hyperlaktatämie nachweisen.

In der Literatur werden die Effekte von Iloprost bzw. Dopexamin auf den Laktat Spiegel ähnlich beschrieben. Trotz teilweise signifikanter Verbesserung der Durchblutung verschiedener Organe wird die Hyperlaktatämie meist nicht beeinflusst [250; 290].

Quellen der Laktatproduktion bei Endotoxinämie und Sepsis sind im wesentlichen Darm, Muskulatur und Haut [302]. Weitere Laktatproduzenten sind Herz, Lunge und Erythrozyten. Somit kann eine Hyperlaktatämie oder Laktatazidose keinem Organ primär zugeordnet werden, es sei denn, spezifische Prozesse (z.B. Darm-Infarkt) sind bekannt.

Laktat fällt ausschließlich im Glukosestoffwechsel an. Glukose wird zunächst –sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen – bis zum Pyruvat abgebaut. Die Energiebilanz beträgt bis hierher 2 mol ATP. Unter aeroben Bedingungen wird das Pyruvat mittels der Pyruvatdehydrogenase abgebaut und tritt über die Zwischenstufe Acetyl-CoA in den Citratzyklus ein. Dort erfolgt der Abbau bis zum CO₂, wobei dann summarisch 38 mol ATP pro mol Glukose gewonnen wurden. Unter aneroben Bedingungen wird das für den Glukoseabbau benötigte oxidierte NAD durch die Reaktion von Pyruvat zu Laktat (Laktatdehydrogenase) gewonnen. Auch bei stimulierter anaerober Glykolyse bleibt das Verhältnis Laktat/Pyruvat zunächst konstant (10:1). Es entsteht zwar vermehrt Laktat, jedoch noch keine Azidose. Erst bei verstärktem ATP-Abbau infolge einer Hypoxie im Gewebe

entstehen Wasserstoffionen, die das Reaktionsgleichgewicht verschieben und zu einer weiteren Laktatbildung führen. Der dann veränderte Laktat/Pyruvat-Quotient kann die nichthypoxische Hyperlaktatämie von der hypoxischen Laktatazidose unterscheiden. Zusätzlich akkumuliert beim ATP-Abbau AMP, das die Glykolyse nochmals stimuliert (*Pasteur-Effekt*) und eine weitere Laktatproduktion auslöst.

Die Perfusionsstörung multipler Organe bei Endotoxinämie, die zur Hypoxie im Gewebe führt, ist nicht die einzige Ursache für erhöhte Laktatwerte. Endotoxin selbst kann durch eine Stimulation der Glukose-Transporter-Protein-Synthese die Glykolyse stimulieren und durch die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase den Laktatweg forcieren [57; 120; 304]. Jones et al. fanden bei endotoxämischen Ratten eine verminderte Aktivität der Pyruvat-Kinase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Pyruvat-Carboxylase verbunden mit einer um 50% verminderten Glukoneogenese. Sie postulierten, dass in der Endotoxin-induzierten Hemmung der PEPCK die Ursache einer verminderten Glukoneogenese verbunden mit einem Laktatanstieg gesehen werden kann [145]. Eine gestörte Leber- bzw. Nierenfunktion (Hauptorgane der Laktatverstoffwechselung) kann *per se* zu einer Laktatakkumulation führen [160]. Endogene oder exogene Katecholamine können direkt (Stimulation der Glykolyse) oder indirekt (Reperfusion hypoxischer Gewebe nach Kreislaufstabilisierung – „Laktat-washout“) eine Laktatfreisetzung verursachen [23]. Die Beurteilung erhöhter Laktatwerte ist somit komplex und nicht auf die Feststellung einer minderperforationsbedingten Hypoxie im Gewebe zu reduzieren.

6.2.3 Leukozyten

Definitionsgemäß zählt eine Leukopenie ($< 4 \text{ GPt/l}$) oder Leukozytose ($> 12 \text{ GPt/l}$) zu den Markern einer Sepsis [35]. Bei experimentellen Modellen mit Endotoxin-Applikation kommt es in der Regel initial zu einer ausgeprägten Leukopenie [8; 14; 110; 209; 221; 272]. Sie gilt als Indikator für die Sepsis-Induktion [254]. Dem initialen Leukozytensturz kann sich infolge der verzögerten Freisetzung aus dem Knochenmark bei längerer Beobachtungszeit eine reaktive Leukozytose anschließen. Als Ursache für das Verschwinden der Leukozyten aus dem peripheren Blut gilt die endotoxininduzierte Leukozytenadhärenz in der Endstrombahn verschiedenster Organe verbunden mit Änderungen in der Mikrohämodynamik

[166; 288].

In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS fanden wir nach zwei Stunden Endotoxinämie Leukozytenzahlen um 1,5 GPt/l im peripheren Blut. Die Gabe des Lazaroids U-74389G bzw. Iloprost konnte im Gegensatz zur Oxypurinol- bzw. Dopexamintherapie den initialen Leukozytenrückgang vermindern. Nach vier Stunden Endotoxinämie lagen die Werte aller Gruppen um 2 GPt/l. Die Kontrollgruppe zeigte stabile Leukozytenzahlen.

Bei Applikation von 20 mg/kg KG LPS sank die Leukozytenzahl zum Zeitpunkt 4 h bis auf 1 GPt/l ab. Keine der untersuchten Substanzen hatte einen Einfluss auf die peripheren Leukozytenzahlen bei dieser Endotoxindosis.

6.3 Intravitalmikroskopie

Anhand der hämodynamischen und laborchemischen Veränderungen konnte gezeigt werden, dass das etablierte Versuchsmodell charakteristische klinische Konstellationen bei Sepsis widerspiegelt. Es ergaben sich erste Hinweise für Effekte der untersuchten Substanzen bei Endotoxinämie. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung des Einflusses der ausgewählten antioxidativen bzw. vasoaktiven Substanzen auf die intestinale Mikrozirkulation als zentralem Protagonisten in der Entwicklung des septischen Multiorganversagens.

Die Intravitalmikroskopie bietet herausragende Möglichkeiten für die Beurteilung der Mikrozirkulation *in vivo* [315]. Statische Methoden wie Laborparameter oder histologische Schnitte können nur Momentaufnahmen der mikrohämodynamischen Situation wiedergeben. Die Intravitalmikroskopie erlaubt es, dynamische Prozesse in der Endstrombahn, wie die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Kapillarperfusion, zu beurteilen [203].

6.3.1 Leukozytenadhärenz

Der Vorgang der Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie ist ein mehrstufiger Prozess (Einzelmechanismen auf zellulärer Ebene siehe Einleitung, Kapitel 2.1.2.3). Am Anfang steht

die verstärkte Margination der Leukozyten aus der Blutstrommitte. In der Folge kommt es zum temporären Adhären der Leukozyten am Endothel der Gefäßwand, dem sogenannten Leukozytenrolling [184; 186]. Der nächste Schritt ist die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel, das Leukozytensticking [105]. Die aktivierten Leukozyten setzen eine Reihe von Mediatoren frei (z.B. Sauerstoffradikale, Elastase, Kollagenase, Myeloperoxidase), die das Endothel angreifen, die Gefäßpermeabilität erhöhen und weitere Kaskadensysteme aktivieren können [121; 236; 309]. Mit der Emigration der Leukozyten aus den Blutgefäßen nimmt die Gewebeschädigung ihren Fortgang [122]. Ein Durchbrechen dieses Szenarios im Sinne einer Verminderung der Leukozytenadhärenz am Endothel stellt somit einen therapeutischen Ansatz bei Endotoxinämie bzw. Sepsis dar. Die intestinale Schädigung durch aktivierte Leukozyten und mögliche Folgereaktionen, wie die Translokation von Bakterien und Toxinen aus dem Darmlumen in die Zirkulation, könnten so vermindert werden.

Auch unter physiologischen Bedingungen - am intakten Gewebe - wird ein spontanes Leukozytenrolling beobachtet. Der Anteil rollender Leukozyten kann bis 45 % der Gesamtleukozyten betragen („rolling pool“ [9; 37; 199]). Das Ausmaß hängt von der Art des untersuchten Gewebes ab. Der Vorgang wird als Bereitschaft der Leukozyten für eine jederzeitige Aktivierung im Rahmen der Immunabwehr interpretiert [139]. Dauerhaft adhären Leukozyten werden unter Normalbedingungen (Wachheit, Stressfreiheit, Abwesenheit von Pathogenen oder Testsubstanzen) in der Regel nicht beobachtet [199].

Janssen et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Anästhetika auf das spontane Leukozytenrollen. Sie empfahlen für Untersuchungen der Mikrozirkulation das Pentobarbital, da es z.B. im Gegensatz zum Fentanyl keine Auswirkungen auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion hat [140]. *Schmidt* et al. berichteten für das Ketamin von einer Verringerung der Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie [255]. Wir setzten für unsere Untersuchungen Pentobarbital ein.

Aussagen zum spontanen Leukozytenrollen lassen sich im engeren Sinne nur an noninvasiv zugänglichen Geweben (Nagelbett, Haut, Auge) zuverlässig treffen, da jedes operative Trauma eine Leukozytenaktivierung bewirken kann.

Unter unseren Versuchsbedingungen wurde auch in der Kontrollgruppe ein deutliches Rollen der Leukozyten verzeichnet. Ein verstärktes spontanes Leukozytenrolling kann allein durch die Gewebeauslagerung bedingt werden, wie *Fiebig* et al. am Mesenterium zeigten [76]. Diese Autoren beobachteten an Mesenterialvenen bereits fünf Minuten nach

Auslagerung des Gewebes eine signifikante Zunahme des spontanen Leukozytenrollens. Dieses Phänomen war auch nach 30 Minuten nachweisbar. Da unsere mikroskopischen Untersuchungen ca. 15 Minuten nach Auslagerung begonnen wurden, interpretieren wir die hohe Anzahl rollender Leukozyten der Kontrollgruppe im Sinne der von diesen Autoren beschriebenen Veränderungen.

Massberg und *Boros* [37; 195] geben den normalen Anteil rollender Leukozyten an der Gesamtzahl der freifließenden Leukozyten in der intestinalen Submukosa bei Intravitalmikroskopie mit bis zu 10 % in den größeren V1-Venolen und bis 25 % in den kleineren V3-Venolen an. Sie begannen die Untersuchungen nach einer 20-minütigen Stabilisierungsperiode.

Eine differente Methode zur Beschreibung lokaler Leukozytenadhärenz ist das Aufstellen des Quotienten zwischen systemischer und regionaler Leukozytenzahl. Dieser Quotient beträgt im Mesenterium nach Auslagerung 1:6. Nach 45 Minuten Auslagerung wird am Mesenterium eine 100fach höhere Konzentration von polymorphonukleären Zellen gemessen als in der systemischen Zirkulation [322].

Andere Gruppen beschreiben das Leukozytenrollen mit dem Parameter Roller-Flow (Anzahl rollender Leukozyten/Zeiteinheit). *Gaboury* et al. [90] registrierten bei Normaltieren in einem Intravitalmikroskopie-Modell am Mesenterium einen Roller-Flow von 20 Zellen/min. Bei etwa gleichen Ausgangswerten fand *Ley* nach 40 Minuten einen Maximalwert von 80 Zellen/min im Mesenterium [185]. In der Folge ging der Roller-Flow in dieser Studie wieder zurück. Am Darm fanden *Scalia* et al. [249] Baseline-Werte von 15-20 rollenden Leukozyten pro Minute. Wir fanden in der Submukosa unserer Kontrolltiere durchschnittlich 50 rollende Leukozyten pro Minute (Untersuchungszeitraum 20 min).

In den unbehandelten Endotoxin-Gruppen fanden wir eine signifikant niedrigere Anzahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit als in der Kontrollgruppe ohne Endotoxin. Ein vermindertes Leukozytenrollen erscheint unter Berücksichtigung des sequentiellen Ablaufs der Leukozytenaktivierung und der Zunahme der Anzahl fest adhärenter Leukozyten als paradox.

Erklärt werden kann dieser Effekt zum einen durch eine überproportionale Ausprägung der festen Leukozytenadhärenz in der Mikrozirkulation. Durch die LPS-Gabe adhären die Leukozyten in einem solchen Ausmaß fest am Endothel, dass kaum noch rollende Leukozyten beobachtet werden können. Diese Interpretation wird durch den Befund der LPS-induzierten Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut unserer Versuchstiere

gestützt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren kurz nach LPS-Applikation beschrieben. So konnten *Baatz et al.* [9] zwei Stunden nach LPS-Applikation eine Verminderung des Leukozytenrolling in Gefäßen der Uvea um bis zu 30 %, begleitet von einem Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild, feststellen. *Baatz* wie auch *Traber et al.* [296] konnten zeigen, dass es bei längerer Beobachtungszeit (ca. 6 h nach Applikation des LPS) zu einem Wiederanstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild kommt. Dieser zeitliche Ablauf ist durch die verzögerte Freisetzung aus dem Knochenmark in Verbindung mit einer weiteren Entwicklung des Entzündungsgeschehens erklärbar. So sah *Baatz* vier bis sechs Stunden nach LPS-Applikation ein zunehmendes Leukozyten-Rolling bei konstant erhöhter fester Leukozytenadhärenz. Der Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten war somit nicht durch ein Ablösen schon adhärenter Leukozyten, sondern durch ein Nachliefern von Leukozyten verursacht [9]. Auch *Traber* konnte im Schafmodell acht bis zehn Stunden nach LPS-Bolusapplikation einen Wiederanstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild beobachten. Weiterhin konnte er zeigen, dass dieser Wiederanstieg der Leukozytenzahl vor allem durch Granulozyten verursacht war. Die Nachlieferung der Leukozyten scheint deshalb vordergründig durch eine aktivierte Granulopoese verursacht zu sein [296]. Die Leukopenie persistierte in unserer Studie bis zum Versuchsende. Eine Erholung der Leukozytenzahl über den Versuchsverlauf wurde möglicherweise deshalb nicht beobachtet, weil wir eine kürzere Versuchszeit wählten und in unserem Modell eine höhere LPS-Dosis als bei den o.g. Autoren verwendet wurde.

Zum anderen kann in Abhängigkeit vom Leukokrit in der Mikrozirkulation auch eine verminderte absolute Anzahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit rechnerisch durchaus einer relativen Zunahme der Anzahl der rollenden Leukozyten entsprechen. Desweiteren kann z.B. bei einer venolären Vasokonstriktion eine absolut verminderte Anzahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit und Gefäßsegment trotzdem mit einer relativ erhöhten Anzahl rollender Leukozyten pro mm² Endothel korrelieren. Wir konnten jedoch keine signifikante Reduktion der venolären Gefäßdurchmesser nach LPS-Applikation in unserem Versuchsmodell beobachten.

Die Anzahl fest adhärenter Leukozyten in unserer unbeeinflussten Kontrollgruppe war vergleichbar mit Literaturangaben [100; 195]. Nach Gabe von 5 mg/kg KG LPS vervierfachte sich die Anzahl fest adhärenter Leukozyten in den V1- und V3-Venolen. *Fukumura et al.* [88] beschrieben nach Gabe von 2 mg/kg KG Endotoxin (*E. coli* O111:B4) in den V1-Venolen eine Zunahme des Leukozytenstickings um den Faktor 8 und in den V3-

Venolen um den Faktor 17. Wir sahen nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS eine Versechsfachung der Anzahl stickender Leukozyten in den V1-Venolen und eine Verfünffachung in den V3-Venolen.

Die vermehrte Leukozytenadhärenz war nicht auf makrohämodynamische Veränderungen zurückzuführen, da es keine signifikanten Unterschiede im mittleren arteriellen Blutdruck zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen zum Mikroskopiezeitpunkt gab.

6.3.1.1 Einfluss antioxidativer Substanzen

Die Gabe von Oxypurinol beeinflusste die LPS-induzierten Veränderungen des Leukozytenrollings nicht. Die Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten (Sticker) wurde aber in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS in den V1-Venolen und in der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS in den V1- und V3-Venolen signifikant vermindert. Es bestand jedoch noch ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Das Lazaroid U-74389G beeinflusste die LPS-abhängige Leukozyten-Endothel-Interaktion in stärkerem Ausmaß als das Oxypurinol. In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS verhinderte die Lazaroid-Therapie die in der unbehandelten LPS-Gruppe beobachteten Veränderungen im Roller-Flow. Erst bei erhöhter Endotoxin-Belastung war der Effekt nicht mehr nachweisbar. Die feste Leukozytenadhärenz wurde ähnlich wie bei Oxypurinolgabe in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS in den V1-Venolen und in der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS in den V1- und V3-Venolen signifikant vermindert. Die Werte lagen in der Versuchsreihe mit erhöhter Endotoxin-Belastung jedoch signifikant unter denen der mit Oxypurinol behandelten Tiere.

Wie von anderen Arbeitsgruppen [88] beschrieben [100; 195], fanden wir eine stärkere Leukozytenadhärenz in den Venolen mit kleinerem Durchmesser (V3) als in den Venolen mit größerem Durchmesser (V1).

Dieser Unterschied kann durch eine unterschiedliche Scherrate in diesen Gefäßpopulationen hervorgerufen werden. Die Scherrate wird in Newtonschen Flüssigkeiten nach der Formel $\gamma = 8(V_m / D)$ (V_m = Geschwindigkeit in Strommitte; D = Durchmesser) bestimmt. *Miura* et al. konnten in Venolen 1. Grades des Dünndarms eine 2,7fach höhere

Geschwindigkeit als in V3-Venolen messen [206]. Der Durchmesser der Gefäße unterscheidet sich in unseren Messungen jedoch nur um den Faktor 2. Dies lässt in den größeren Venolen eine höhere Scherrate als in den Venolen 3 Grades erwarten.

Der Blutstrom erfüllt jedoch kaum die Bedingungen einer Newtonschen Flüssigkeit. Zusätzliche Einflüsse, wie z.B. Hämatokrit, Strömungseigenschaften, Vasomotion und Wechselwirkungen zwischen Blutbestandteilen und Gefäßendothel sind zu berücksichtigen. Somit kann beispielsweise eine erhöhte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen in den V3-Venolen eine verstärkte Leukozytenadhärenz verursachen.

Die verminderte feste Adhärenz der Leukozyten in den V1-Venolen kann auch die bevorzugte Wirkung der antioxidativen Substanzen in den V1-Venolen in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS erklären. Da in den V1-Venolen die Ablösung der Leukozyten durch die erhöhten Scherkräfte oder andere Faktoren *a priori* erleichtert wird, werden die Effekte der Testsubstanzen hier eher zum Tragen kommen.

Reaktive Sauerstoffspezies, die bei Endotoxinämie und Sepsis in verstärktem Umfang anfallen (siehe Einleitung, Kapitel 2.1.2.2) sind maßgeblich an der Ausprägung der Leukozyten-Endothel-Interaktion beteiligt [163; 212]. Sie spielen eine Rolle bei der Induktion des für das Leukozytenrollen wichtigen P-Selectins auf Endothelzellen [227] und bei der Expression von Integrinen (entscheidend für das Leukozytensticking) auf Granulozyten [295]. Zusammenhänge mit der Bildung von PAF, eines starken Induktors der Leukozytenadhärenz, sind beschrieben [163; 183]. Eine antioxidative Therapie erscheint also als sinnvoller Ansatz zur Reduktion der Leukozytenadhärenz.

Für die unterschiedliche Effektivität der beiden eingesetzten antioxidativen Substanzen können verschiedene Erklärungen herangezogen werden. Vom Wirkprinzip her bestehen deutliche Unterschiede.

Lazaroid (21-Aminosteroid) sind strukturell Abkömmlinge des Methylprednisolons und hemmen effektiv die radikalische Lipidperoxidation [116]. Sie fangen insbesondere Lipidperoxyl- und Phenoxyradikale ab. In Ischämie-Reperfusions-Modellen verhinderte die Aminosteroid-Applikation eine Akkumulation von Neutrophilen und schützte die Endothelstruktur [73; 265]. Das Lazaroid Tirilazad mesylate (U-74006F) hemmte die Leukozytenadhärenz an Interleukin 1-stimulierten Endothelzellen [216]. Am Mesenterium konnte eine Reduktion der Leukozytenadhärenz und eine Verminderung der Gefäßpermeabilität bei Endotoxinämie unter Lazaroid-Therapie gezeigt werden [256]. Den Lazaroiden werden membranstabilisierende Eigenschaften zugeschrieben [327]. Es ist

denkbar, dass eine membranstabilisierende Wirkung Konformationsänderungen der Leukozyten behindert, die nötig sind, damit die von ihnen exprimierten Integrine Adhäsivität erlangen [184; 277].

Die Applikation von Oxypurinol konnte aus galenischen Gründen nur intraperitoneal erfolgen. Die Resorption ist bei Endotoxinämie schwer abzuschätzen. Ein Dosisvergleich mit dem Lazaroid erscheint *a priori* nicht durchführbar. Oxypurinol wirkt in der von uns verwendeten Dosierung nicht nur als spezifischer Inhibitor der Xanthinoxidase, sondern auch als direkter Radikalfänger [210]. Die Xanthinoxidase gilt neben der leukozytären NADPH-Oxidase bei Endotoxinämie und Sepsis als Hauptbildner reaktiver Sauerstoffradikale. Eine Beteiligung Xanthinoxidase-generierter Radikale bei der Induktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion in Mesenterialvenen konnte durch die Infusion von Hypoxanthin kombiniert mit Xanthinoxidase an Ratten gezeigt werden [91]. Eigene Untersuchungen zeigten protektive Effekte von Oxypurinol bei Darm- und Extremitäten-Ischämie und –Reperfusion [175; 176; 188]. In einem anderen Ischämie-Reperfusions-Modell war Allopurinol in der Lage, die Leukozytenextravasation und Leukozytenadhärenz zu hemmen [104]. Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass Allopurinol oder Oxypurinol wirkungsvoll die Endotoxin-induzierte Leukozytenadhärenz im Intestinum inhibieren können.

6.3.1.2 Einfluss vasoaktiver Substanzen

Bezüglich der Anzahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit fanden wir in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS geringe, jedoch signifikante Effekte durch die Gabe von Dopexamin im Vergleich zu den unbehandelten bzw. mit Iloprost therapierten Endotoxin-Gruppen. In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS sahen wir eine signifikante Reduktion der Anzahl fest adhärenter Leukozyten durch beide vasoaktive Substanzen. Beide Testsubstanzen erreichten jedoch nicht die Effektivität des Lazaroids U-74389G. Das Leukozytenrollen wurde in beiden Versuchsreihen (5 / 20 mg/kg KG LPS) weder durch Iloprost- noch durch Dopexamin-Therapie beeinflusst.

In einem *in vitro*-Ansatz konnten Riva et al. [244] eine Inhibition der Neutrophilen-Adhärenz an endothelialen Monolayers durch Iloprost zeigen. An humanem Endothel beschrieben Nicolini et al. [219] eine Verminderung der Leukozytenadhärenz bei Iloprost-Applikation. Vorhergehende Arbeiten mit Prostacyclin hatten schon eine Beeinflussung der

Leukozytenadhärenz bei inflammatorischen Prozessen nachweisen können [98; 146]. Zu unseren Untersuchungen vergleichbare, intravitalmikroskopische Studien mit Endotoxin als Trigger der Leukozyten-Endothel-Interaktion sind in der Literatur nicht beschrieben. Die Ergebnisse entsprechen jedoch den zitierten Effekten auf die Leukozytenadhärenz. Ein wesentlicher Mechanismus für den Effekt von Prostacyclin bzw. Iloprost scheint die rezeptorvermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase zu sein, da ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel die Neutrophilenadhäsivität vermindert [49]. Da Prostacyclin die leukozytäre Superoxidproduktion vermindert, kommen auch die für die antioxidativen Substanzen diskutierten Mechanismen in Frage [74]. Ebenso wird die PAF-induzierte Leukozytenadhärenz beeinflusst. *Mentz et al.* [204] untersuchten diesen Zusammenhang und fanden inhibitorische Effekte von Iloprost.

Für Dopexamin konnte am Mesenterium eine Reduktion der Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie nachgewiesen werden [259]. Analoge Untersuchungen an der Darmwand existieren nicht. Es gibt aber weitere Hinweise für antiinflammatorische Eigenschaften des Dopexamins. *Berendes et al.* [22] fanden bei Patienten nach Bypassoperationen unter Dopexamin-Therapie niedrigere Plasmaspiegel von Interleukin 6, Serumamyloid A und C-reaktivem Protein. Die antiinflammatorischen Eigenschaften von Dopexamin und anderen β -Mimetika werden über G-Protein-abhängige Prozesse vermittelt [294]. Das G-Protein stimuliert die Adenylatcyclase und die Proteinkinase A. *Mannan et al.* [190] berichteten von einer Reduktion der LPS-induzierten, cAMP-abhängigen P-Selectin-Expression an isolierten humanen Neutrophilen durch Dopexamin. Die Proteinkinase A ist an der Regulation der Synthese antiinflammatorischer Mediatoren - wie Interleukin 10 - beteiligt. *Schmidt* registrierte bei Dopexamininfusion eine verminderte Harnsäureproduktion nach Endotoxinbelastung und stellte damit einen Zusammenhang mit einer Reduktion der Radikalbildung aus dem Xanthinoxidaseweg her [254]. Dieser antioxidative Effekt kann zur Verminderung der Leukozytenadhärenz beitragen.

Bei der Applikation von vasoaktiven Substanzen scheint in diesem Zusammenhang auch der primäre Effekt der Perfusionsverbesserung von Bedeutung zu sein. Es ist bekannt, dass die Leukozytenadhärenz von den wirkenden Scherkräften abhängig ist. Bei Restoration normaler Flussverhältnisse kommt es zu einer Zunahme der Scherkräfte, die eine Leukozytenadhäsion erschweren [105].

6.3.2 Funktionelle Kapillardichte

Es existieren in der Literatur z.T. widersprüchliche Untersuchungen zur Kapillarperfusion in der Darmwand bei Endotoxinämie. Die Hypothese einer Endotoxin-induzierten Minderperfusion - insbesondere der Mukosa - wird u.a. durch die Arbeit von *Theuer et al.* [291] gestützt, die bei einer normotensiven Bakteriämie eine 30%ige Vasokonstriktion in intestinalen A1- und A3-Arteriolen aufdeckten. Die Mukosaperfusion ging dabei um ca. 40% (Messung mittels Laser-Doppler-Flowmetrie) zurück. *Drazenovic et al.* [69] hatten bereits mittels Carbon-Injektionstechnik eine verminderte funktionelle Kapillardichte nach Endotoxingabe zeigen können. *Schmidt et al.* [257] bestätigten intravitalmikroskopisch die villöse Minderperfusion bei Endotoxinämie (35 % Reduktion des villösen Blutflusses). *Farquhar et al.* [75] fanden vergrößerte interkapilläre Areale als Ausdruck einer verminderten Kapillardichte in einem CLP-Modell an der Ratte.

Nevière et al. [218] konnten dies in einem *Pseudomonas*-Sepsis-Modell nicht bestätigen und postulierten daher, dass eine verminderte Kapillardichte in der Mukosa keine *conditio sine qua non* für eine mukosale Perfusions- und Permeabilitätsstörung sei. Auch *VanderMeer et al.* sahen keine mukosale Hypoperfusion bei Endotoxinämie im Tierexperiment (Laser-Doppler-Flowmetrie), obgleich eine intramukosale Azidose messbar war [303].

Revelly et al. [241] wiesen mit der Mikrosphärentchnik im Endotoxinschock am Schwein nach, dass es bei Endotoxinämie zu einer Umverteilung der Durchblutung in der Darmwand zugunsten der Mukosa und zum Nachteil der Muskularis kommt. (Die normale Verteilung der intestinalen Blutmenge ist nach Untersuchungen von *Gore* und *Bohlen* 30% in der Muskularis und 70% mukosal [103].) Der Gesamtfluss zum Darm blieb in dieser Studie konstant. Die mukosale Hyperperfusion korrelierte invers mit dem Mukosa-pH. *Nöldge et al.* [220] beobachteten bei kontinuierlicher LPS-Infusion beim Schwein einen Abfall des mukosalen pO₂ und des Mukosa-pH, wogegen sich jedoch die serosalen pO₂-Werte nicht signifikant gegenüber den Ausgangswerten veränderten.

Die Erkennung von Veränderungen in der Kapillarperfusion der Darmwand bei Endotoxinämie ist offensichtlich abhängig vom gewählten Versuchsmodell und der benutzten Methodik. Die Hypothese, dass eine mukosale Perfusionsverminderung von pathogenetischer Relevanz für die Entwicklung einer intestinalen Hyperpermeabilität ist, wird durch tierexperimentelle Studien untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass eine gestörte

Darmpermeabilität vor allem in minderperfundierten Darmabschnitten auftritt [217; 321].

Störungen der Mikrozirkulation scheinen aber nicht allein für die gestörte intestinale Permeabilität verantwortlich zu sein. So konnten *Fink* et al. bei einer mechanischen Verminderung der mesenterialen Perfusion auf Werte, wie sie bei der Endotoxinämie beobachtet werden, noch keine Störung der intestinalen Permeabilität beobachten [77]. Da eine Endotoxin-induzierte, mukosale Azidose sogar ohne Nachweis einer intestinalen Ischämie gezeigt werden konnte, ist die These einer Störung der intestinalen Permeabilität durch eine alleinige, mukosale Hypoperfusion nicht zu halten [303]. Das Zusammenspiel verschiedener pathogener Faktoren scheint schließlich eine Endotoxin-induzierte Schädigung der Darmbarriere zu bewirken.

In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS fanden wir trotz signifikant reduzierter Werte des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses, gemessen mit der Laser-Doppler-Flowmetrie, keine Veränderungen in der funktionellen Kapillardichte der Mukosa und der Muskularisschichten. Damit bestätigten sich die o.g. Beobachtungen von *Nevière* et al. [218].

Nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS fanden wir bei unveränderter FCD der Mukosa eine signifikant reduzierte FCD in der longitudinalen und zirkulären Muskularis. Dies könnte der von *Revelly* et al. beschriebenen Umverteilung der Darmwanddurchblutung bei Endotoxinämie zuzuschreiben sein [241].

Möglicherweise geht dem manifesten Kapillarperfusionsausfall zunächst eine mit der von uns eingesetzten Methode nicht nachweisbare Verlangsamung der Blutströmung voraus [257].

6.3.2.1 Einfluss antioxidativer Substanzen

Die bei Gabe von 5 mg/kg KG LPS unveränderte funktionelle Kapillardichte der Mukosa und Muskularis wurde auch durch die Applikation des Lazaroids U-74389G bzw. Oxypurinol nicht beeinflusst.

In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS konnte durch die Therapie mit Oxypurinol die funktionelle Kapillardichte sowohl in der longitudinalen als auch in der zirkulären Muskularisschicht signifikant verbessert werden.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen registrierten *Krysztopik et al.* [161] eine Verbesserung der intestinalen Perfusion durch die Gabe des Lazaroids U-74389G. Intravitalmikroskopisch sahen sie eine Reduktion der Vasokonstriktion in den A1- und A3-Arteriolen. Dies war mit einer Verbesserung des Blutflusses um 21% assoziiert.

Nach Endotoxin-Injektion konnte tierexperimentell und am Menschen eine Freisetzung von Noradrenalin und Endothelin nachgewiesen werden [147; 243]. Diese beiden Substanzen sind starke endogene Vasokonstriktoren, die zu einer intestinalen Minderperfusion führen können [135; 228]. Die Applikation des antioxidativen Coenzym Q₁₀ führte zu einer signifikanten Reduktion der endogenen Adrenalin- und Noradrenalinfreisetzung in einem tierexperimentellen Modell des septischen Schocks [180].

Eine Verbesserung der Kapillarperfusion in der Darmwand bei Endotoxinämie konnte jedoch nicht für alle bisher untersuchten Antioxidantien gefunden werden. So fanden *Arvidsson et al.* [8] bei Einsatz von SOD/Katalase keine Verbesserung der Mukosaperfusion (Mikrosphärentechnik).

Als Ursache für die Verbesserung der Kapillarperfusion durch Antioxidantien wird vor allem die Reduktion der Freisetzung vasokonstriktiver Mediatoren (z.B. Leukotriene, Thromboxan, Noradrenalin) im Rahmen der Beeinflussung des inflammatorischen Gesamtgeschehens gesehen (siehe Kapitel 6.4 und 6.6).

Relevant scheint auch das Gleichgewicht der beiden Mediatorkomplexe ROS und NO zu sein. Entzieht man diesem System die vasokonstriktorisch wirksamen ROS, kann es zum Überwiegen der Vasodilatation durch NO kommen und *vice versa* [19; 162].

6.3.2.2 Einfluss vasoaktiver Substanzen

In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS fiel bei Iloprost-Gabe im Vergleich zu den anderen Endotoxin-Gruppen eine signifikant erhöhte FCD in der Mukosa auf. Gleichzeitig war die FCD in der zirkulären Muskularisschicht erniedrigt.

In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS war dieses Phänomen reproduzierbar. Zusätzlich fanden wir in der longitudinalen Muskularis erniedrigte FCD-Werte. Allerdings waren bei Applikation von 20 mg/kg KG LPS auch in der unbehandelten LPS-Gruppe die Muskularis-FCD-Werte erniedrigt.

Obwohl die genannten Veränderungen gering ausgeprägt waren, bestand doch eine

statistische Signifikanz. Offensichtlich liegt hier eine Verstärkung der bei Endotoxinämie beschriebenen Umverteilung des Blutflusses von der Muskularis in die Mukosa im Sinne eines Steal-Syndroms vor [241].

Dieser Effekt ist bei der Anwendung von β -Mimetika, wie Dopexamin, beschrieben [267], für Iloprost jedoch bisher nicht bekannt.

Manasia et al. [189] stellten ebenfalls unter Iloprost-Infusion bei endotoxininduzierter intestinaler Hypoperfusion eine Verbesserung des mesenterialen Blutflusses (+ 34 %; gemessen in der A. mesenterica superior) fest. Zwar konnten sie nicht zwischen einzelnen Darmwandschichten unterscheiden, dennoch zeigten sie mittels Tonometrie eine Verringerung der intramukosalen Azidose. Einen analogen Effekt wiesen *Radermacher et al.* [239] bei septischen Patienten nach. Unter Prostacyclin-Infusion kam es zum pH_i -Anstieg.

In Anbetracht der bei intramukosaler Azidose und/oder mukosaler Hypoperfusion zu befürchtenden intestinalen Permeabilitätsstörungen [247; 303] muss der Summeneffekt der Iloprost-Gabe trotz des Umverteilungsphänomens als protektiv bewertet werden.

Obwohl bei Iloprost-Gabe aufgrund der Reduktion des peripheren Widerstands teilweise ein erhöhtes Herzzeitvolumen gemessen wird, scheint dies nicht allein für die perfusionsverbessernde Wirkung verantwortlich zu sein. Vielmehr wird die Stabilisierung des Thromboxan-Prostacyclin-Gleichgewichts in der Mikrozirkulation und die Beeinflussung sekundärer Mediatoren als entscheidend diskutiert [25; 189].

Die Dopexamin-Applikation führte zu keinen Veränderungen der funktionellen Kapillardichte in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS.

Nach Infusion von 20 mg/kg KG LPS konstatierten wir ein im Vergleich zur Iloprost-Behandlung divergentes Bild. Wir fanden eine signifikante Verbesserung der in den anderen Endotoxin-Gruppen deutlich reduzierten FCD in beiden Muskularis-Schichten. In der longitudinalen Muskularis konnten nahezu die Werte der Kontrollgruppe eingestellt werden.

In Vorgriff auf die Ergebnisdiskussion der Laser-Doppler-Flowmetrie sei in diesem Zusammenhang auf die signifikante Steigerung des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses durch Dopexamin in der vorliegenden Arbeit hingewiesen.

Wir bewerten die Veränderungen als eine im Vergleich zu Iloprost-Gabe stärkere Zunahme der intestinalen Perfusion. Ein Steal-Phänomen innerhalb der Darmwand blieb daher aus.

Schmidt et al. [258] demonstrierten intravitalmikroskopisch eine signifikante

Verbesserung der villösen Mikrozirkulation (Arteriolendurchmesser, Blutfluss) bei Gabe von 2,5 µg/kg/min Dopexamin während Endotoxinämie im Rattenmodell. Analog zu unseren Ergebnissen der Bestimmung der funktionellen Kapillardichte konnte die Dopexamin-Behandlung zur Kontrollgruppe identische Verhältnisse herstellen. In einem anderen Modell berichteten *Steinberg et al.* [283] von einer signifikanten Verbesserung des Blutflusses in den A1-Arteriolen bei Dopexamininfusion.

In Analogie zu den Feststellungen bei Gabe von Iloprost müssen zur Diskussion der beobachteten Veränderungen neben den für Dopexamin gut dokumentierten Wirkungen auf das Herzzeitvolumen [17; 18; 85; 92; 133] weitere Faktoren zur Erklärung des benefiziellen Effektes auf die intestinale Mikrozirkulation herangezogen werden.

Die vorhandenen intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass Dopexamin spezifische Wirkungen in der intestinalen Endstrombahn ausübt. Die Grundlage ist die selektive Bindung an die DA₁- und β₂-Rezeptoren (siehe Kapitel 2.3.2.1). Entsprechende Versuche mit selektiver Rezeptorblockade konnten dies bestätigen [271].

Auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von Dopexamin wurde bereits im Kapitel 6.3.1.2 eingegangen. Die durch die Beeinflussung des gesamten inflammatorischen Geschehens bedingten Veränderungen in der Mikrozirkulation tragen zu den Effekten in Bezug auf die Kapillarperfusion wahrscheinlich ebenfalls bei.

6.4 Tumornekrosefaktor-α

Der Tumornekrosefaktor-α gilt als initialer Mediator im septischen Geschehen (siehe Kapitel 2.1.2.1). Bei experimenteller Endotoxinämie ist er innerhalb weniger Minuten messbar. Je nach Endotoxin-Dosis werden bereits nach ein bis zwei Stunden rückläufige TNF-α-Spiegel registriert [14; 29; 265]. Das nur kurzzeitige Auftreten von TNF-α in der Zirkulation führt dazu, dass im klinischen Ablauf TNF-α-Peaks oftmals nicht erfasst werden und der Parameter daher ungeeignet für ein Monitoring erscheint [264]. Für experimentelle Belange ist TNF-α jedoch ein idealer Indikator für die Sepsisinduktion und den Effekt einer antiinflammatorischen Therapie.

In unserem Versuchsmodell fanden wir nach Gabe von 5 mg/kg KG LPS TNF-α-Spitzenpiegel zum Zeitpunkt 2 h. Die 4 h-Werte waren zwar noch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, jedoch bereits deutlich rückläufig. In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg

KG LPS wurden 50 % niedrigere TNF- α -Werte zum Zeitpunkt 2 h gemessen. Wir vermuteten ein frühzeitigeres Freisetzungsmaximum durch die höhere Endotoxinbelastung und untersuchten daher im Teil 2 der Studie auch den Zeitpunkt 1 h nach Endotoxinämie-Induktion. Es fand sich zu diesem Zeitpunkt ein Maximum in der Höhe des 2 h-Wertes der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. Die 4 h-Werte waren in beiden Versuchsreihen vergleichbar.

Das Ausmaß der TNF- α -Freisetzung nach Endotoxinstimulation (100facher Anstieg) ist mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar [11; 141; 230]. *Boillot et al.* [29] fanden nach Endotoxingabe (50 mg/kg KG LPS) zum Zeitpunkt 1 h Spitzenwerte von 3000 pg/ml in einem immunradiometrischen Assay.

In der Kontrollgruppe wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum lediglich TNF- α -Werte um 50 pg/ml beobachtet. Ähnliche Werte werden bei gesunden menschlichen Versuchspersonen beschrieben [233]. Dies belegt, dass die benutzte invasive Methodik (Katheter in A. carotis und V. jugularis, Tracheotomie, Laparotomie) keinen wesentlichen Einfluss auf diesen Parameter (z.B. im Sinne einer starken, operativ induzierten Inflamationsreaktion) hatte. Die Sensibilität des Parameters für die Endotoxinämie konnte bestätigt werden.

Wir setzten als eine der ersten Gruppen einen rattenspezifischen ELISA ein [172] und konnten damit die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen reproduzieren, denen der speziesspezifische Kit noch nicht zur Verfügung stand [14; 265].

TNF- α wird von Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Neutrophilen und NK-Zellen nach Stimulation durch LPS und Interleukin 1 gebildet. Die Synthese wird durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Interferon- γ , Interleukin 2, GM-CSF, unterstützt, durch Interleukin 6, TGF- β , PGE₂ u.a. inhibiert. TNF- α reagiert über spezifische Rezeptoren, die mit Ausnahme z.B. von Erythrozyten auf den meisten somatischen Zellen vorkommen. Lösliche Rezeptoren und andere TNF- α -bindende Proteine regeln die Aktivität dieses Zytokins. TNF- α induziert u.a. die Aktivierung von nukleärem Faktor (NF- κ B). In Endothelzellen und Leukozyten kommt es dadurch z.B. zur Expression weiterer Zytokine, insbesondere auch von Adhäsionsmolekülen. Dies führt zur verstärkten Leukozytenadhärenz am Endothel (siehe Kapitel 2.1.2.3).

Das frühzeitige Auftreten von TNF- α in der Sepsiskaskade hat zu verschiedenen therapeutischen Versuchen geführt, durch eine Blockade TNF- α -abhängiger Prozesse den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Kortikosteroide, Katecholamine und

Phosphodiesteraseinhibitoren können die TNF- α -Freisetzung hemmen [326]. Der Phosphodiesteraseinhibitor Pentoxifyllin erniedrigte z.B. in einer Studie an kardiochirurgischen Patienten die Inzidenz des Multiorganversagens [129]. Es wurden mono- bzw. polyklonale Antikörper gegen TNF- α entwickelt und in klinischen Studien evaluiert [1; 67; 82]. Bisher zeigten die Studien keine Senkung der Mortalität. In Subpopulationen von Studienpatienten ließen sich jedoch *post hoc* benefizielle Effekte finden. Eine passive Immunisierung gegen TNF- α konnte tierexperimentell letale Effekte von Endotoxin und Viren bei Mäusen abschwächen [136]. Weitere Studien untersuchten die Wirksamkeit von Fusionsproteinen. Dabei wurden lösliche monomere oder dimere TNF- α -Rezeptormoleküle mit der Scharnierregion der schweren Ketten von Maus-IgG1, humanem IgG1 oder IgG3 verbunden. Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von „single-chain antibody fragment“ gegen den TNF-Rezeptor. Antisense-Oligonukleotide können auf mRNA-Ebene die TNF- α -Bildung inhibieren [264].

Durch Gabe hoher Dosen TNF- α können wiederum viele der Befunde und Symptome des septischen Schocks, wie Hypotension und Neutropenie, experimentell erzeugt werden [130; 296]. Insgesamt erscheint die Reduktion der TNF- α -Freisetzung als ein erfolgversprechender Ansatz bei Endotoxinämie und Sepsis.

6.4.1 Einfluss antioxidativer Substanzen

In der Versuchsreihe mit einer Endotoxinbelastung von 5 mg/kg KG LPS sahen wir nach Applikation des 21-Aminosteroids U-74389G eine Reduktion der maximalen TNF- α -Freisetzung zum Zeitpunkt 2 h um 60 %. Die Gabe von Oxypurinol verminderte den TNF- α -Peak um 54 %. Zum Zeitpunkt 4 h wiesen die U-74389G-behandelten Tiere um 57 % reduzierte TNF- α -Werte auf. Bei Behandlung mit Oxypurinol fanden wir zu diesem Zeitpunkt um 16 % niedrigere Werte als in der unbehandelten LPS-Gruppe.

Zu den möglichen Wirkmechanismen der benutzten Antioxidantien, die zu der Verminderung der TNF- α -Freisetzung führten, gibt es in der Literatur verschiedene Hypothesen. *Semrad* et al. [265] konnten *in vivo* mit einem 21-Aminosteroid (U74006F) bei Kälbern die TNF- α -Bildung inhibieren und den Eicosanoidstoffwechsel beeinflussen. Die

Autoren postulieren eine Lipocortin-vermittelte Wirkung der 21-Aminosteroiden auf Proteintranskriptions- und Posttranslationsebene. Als Lipocortine wird ein Spektrum entzündungshemmender Proteine zusammengefasst, die Glukokortikoid-induziert gebildet werden. Zu diesen Lipocortinen gehören z.B. Membranproteine, die die Phospholipase A₂ hemmen. Gegen diese Hypothese spricht, dass glukokortikoidartige Wirkungen der 21-Aminosteroiden im Allgemeinen verneint werden und eine Wirkung über die Synthese von Lipocortinen zuviel Zeit in Anspruch nehmen würde, um den raschen Effekt auf die TNF- α -Freisetzung zu erklären [43; 115; 116; 327].

Da auch Oxypurinol den TNF- α -Anstieg nach Endotoxinbelastung signifikant verringerte, müssen andere Mechanismen für die Wirkung der antioxidativen Substanzen existieren. Eine wesentliche Rolle scheint die Aktivierung des nukleären Faktors (NF-) κ B durch Sauerstoffradikale zu spielen. *In vitro* konnte durch die Applikation von H₂O₂ die NF- κ B-Aktivierung stimuliert werden [262]. NF- κ B ist ein positiv auf die TNF- α -Transkription wirkender zytoplasmatischer Faktor [214]. Unter Ruhebedingungen liegt er im Zytoplasma gebunden an den Inhibitor I- κ B vor. ROS und andere Stimulantien führen zu einer Phosphorylierung von I- κ B und zu einer Freisetzung von NF- κ B, welches in den Zellkern transloziert wird und dort die TNF- α -Transkription auslöst. Daher erscheint es möglich, dass durch die Applikation von Antioxidantien die TNF- α -Aktivierung primär inhibiert bzw. die fortgesetzte TNF- α -Freisetzung im Rahmen der protrahierten ROS-Generierung bei Endotoxinämie gehemmt wird [307].

Der fehlende Effekt der antioxidativen Substanzen in der Versuchsreihe mit höherer Endotoxinbelastung (20 mg/kg KG LPS) kann mit einer möglicherweise zu geringen Dosierung der Substanzen im Zusammenhang stehen. Andererseits kann dieses Ergebnis dadurch verursacht worden sein, dass bei hoher Endotoxinbelastung andere Stimuli (s.o.) in stärkerem Maße die TNF- α -Produktion beeinflussen. Ebenso muss der bereits diskutierte Umstand eines eventuell früheren TNF- α -Peaks in Betracht gezogen werden, so dass ein Effekt der Antioxidantien in dieser Versuchsreihe nicht in Erscheinung trat.

6.4.2 Einfluss vasoaktiver Substanzen

Durch die Gabe von Iloprost bzw. Dopexamin konnten wir eine gleichartige Reduktion der TNF- α -Freisetzung erzielen, wie bei der Behandlung mit den antioxidativen Substanzen. In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS erreichten wir mit der Iloprost-Gabe eine Reduktion des TNF- α -Peaks um 57 % und bei Applikation von Dopexamin eine Reduktion um 61 % zum Zeitpunkt 2 h. Nach vier Stunden betrug die Reduktion noch 43 % (Iloprost) bzw. 49 % (Dopexamin) im Vergleich zur unbehandelten LPS-Gruppe.

Unter erhöhter Endotoxinbelastung (20 mg/kg KG LPS) registrierten wir eine Verminderung der maximal gemessenen TNF- α -Konzentration (Zeitpunkt 1 h) um 36 % bei den mit Iloprost behandelten Tieren und um 47 % in der LPS-Dopexamin-Gruppe. Zum Zeitpunkt 2 h fanden wir noch eine Reduktion der TNF- α -Konzentration um 18 % in der LPS-Iloprost-Gruppe und um 30 % in der LPS-Dopexamin-Gruppe.

Für die Wirksamkeit von Iloprost könnten teilweise Mechanismen auf der Basis antioxidativer Effekte eine Rolle gespielt haben. *Fantone et al.* [74] beschrieben eine Reduktion der Superoxidanionengeneration polymorphkerniger Leukozyten durch Prostacyclinapplikation. Somit könnte eine verminderte Aktivierung von NF- κ B (s.o.) zu einer Verminderung der TNF- α -Produktion geführt haben. *D'Acquisto et al.* [58] konnten auch einen direkten hemmenden Effekt von Iloprost auf die NF- κ B-Aktivierung an J774-Makrophagen nachweisen. Als Ursache postulierten sie eine Verhinderung der proteolytischen Degradation von I- κ B- α und der Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Die Effekte sollen cAMP-abhängig sein.

Jörres et al. [142] konnten ebenfalls einen direkten Effekt von Iloprost auf die TNF- α -Produktion Endotoxin-stimulierter humaner Monozyten zeigen. Die Autoren benutzten eine Iloprost-Dosis, die der klinischen Applikation von 1 ng/kg/min entsprach. Sie fanden eine Beeinflussung der TNF- α -Synthese sowohl auf Transkriptionsebene (Reduktion um 40-50%) als auch auf Translationsebene. Die TNF- α -Sekretion wurde um 20 % reduziert. Dieser Mechanismus wird wahrscheinlich über die Aktivierung der Adenylatcyclase vermittelt. Dies wird indirekt durch die Versuche mit Phosphodiesterasehemmern bestätigt, die über eine cAMP-Erhöhung die TNF- α -Produktion inhibieren können [326].

In einem Enzephalomyelitismodell beschrieben *Jung et al.* [149] eine Reduktion der TNF- α -Produktion von Makrophagen durch Iloprost-Therapie. *Lo et al.* [187] untersuchten den Prostacyclin-Effekt auf Makrophagen näher und deckten einen Zusammenhang mit der

Inhibition Mitogen-aktivierter Protein-Kinasen (MAPK) auf. Auch cAMP-unabhängige Mechanismen, wie die Aktivierung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle, scheinen bei der Vermittlung der Prostacyclinwirkungen eine Rolle zu spielen [53]. Einen Einfluss von Prostaglandinen auf die TNF- α -Freisetzung fanden u.a. auch *Grundmann* et al. [111], *Kunkel* et al. [165] und *Knudsen* et al. [157].

Der β -Agonist Dopexamin übt seine zelluläre Wirkung über cAMP als „second messenger“ aus. Damit erklärt sich die Dopexaminwirkung auf die TNF- α -Aktivierung ähnlich, wie die cAMP-abhängigen Iloprostwirkungen [157]. Eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A. Dies führt zur Phosphorylierung weiterer Enzyme, die maßgeblich an der Regulation der Zytokinproduktion beteiligt sind. Die Aktivierung der Proteinkinase A bewirkt auch eine Hemmung der MAPK (s.o.) und der Phospholipase C [294].

Erkens et al. [71] zeigten an der isolierten Rattenleber eine Reduktion der Endotoxin-induzierten TNF- α -Freisetzung, welche durch die Gabe eines β -Blockers zu antagonisieren war.

Für Dopexamin konnte auch die Inhibition der Synthese anderer inflammatorischer Mediatoren gezeigt werden. So reduziert Dopexamin die LPS-induzierte P-Selectin-Expression von Neutrophilen [190].

6.5 Malondialdehyd

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, ist die Endotoxinämie durch eine massive Generation von reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet (Kapitel 2.1.2.2). Als wesentliche Quellen für die ROS-Entstehung [158; 308] gelten die Leukozyten (NADPH-Oxidase), der Xanthinoxidase-Stoffwechsel, das mitochondriale Elektronentransportsystem, die Arachidonsäurekaskade und Autoxidationsreaktionen. Unter physiologischen Bedingungen werden die ROS durch körpereigene enzymatische oder nichtenzymatische Antioxidantien entgiftet. Infolge ihrer unterschiedlichen Wasser- und Lipidlöslichkeit ist die Wirkung auf bestimmte Kompartimente ausgerichtet (Membranen, Zytoplasma, Extrazellulärraum). Ist die Kapazität der körpereigenen Schutzsysteme – wie z.B. bei Endotoxinämie – erschöpft, kommt es zur Schädigung von Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und anderen biochemischen Strukturen durch die reaktiven Sauerstoffspezies [332].

Die Lipidperoxidation von Biomembranen ist eine der wesentlichsten Folgen der

Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies. Die Zerstörung der Membranlipide geht mit der Bildung von Lipidhydroperoxiden einher. Malondialdehyd ist ein Zerfallsprodukt mehrfach ungesättigter peroxidierten Fettsäuren. Da die direkte Messung von ROS aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit methodisch sehr problematisch ist, benutzten wir als Marker für das Ausmaß der Lipidperoxidbildung während der Endotoxinämie das Malondialdehyd.

Die MDA-Bestimmung wird im Schrifttum sehr häufig zur Quantifizierung der radikalischen Belastung eingesetzt. Dessen ungeachtet bietet die Methode einige Besonderheiten, die zu einer intensiven Diskussion dieses Parameters in der Literatur geführt haben. MDA wird laborchemisch im Test auf Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS = thiobarbituric acid reactive substances) mit nachfolgender HPLC bestimmt (siehe Kapitel 4.3.5). Der erste Analyseschritt, die Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure unter Erhitzen auf 90°-100°C, ist unspezifisch für MDA und erfasst auch andere Lipidperoxydationsprodukte. Erst durch die Auftrennung des chromogenen Reaktionsgemisches mittels HPLC kann der MDA-Anteil bestimmt werden [317]. Es ist zu beachten, dass durch die Reaktionsbedingungen (hohe Temperatur, niedriger pH) artefiziell eine weitere Lipidperoxydation auftreten kann. Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass MDA in biologischen Matrices über sogenannte *Schiff*'sche Basen gebunden vorliegt, d.h. dass es erst durch die Reaktionsbedingungen freigesetzt wird. Außerdem gibt es Interferenzen mit dem Lipidstatus und MDA-Eliminationsvorgängen (MDA wird innerhalb weniger Minuten enzymatisch abgebaut).

Es wird jedoch reproduzierbar eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der durch Sauerstoffradikale ausgelösten Lipidperoxydation und dem Nachweis der MDA-Konzentration im Gewebe oder Blut, z.B. bei Ischämie-Reperfusion-Prozessen oder Endotoxinämie, gefunden. Wir haben diesen Marker daher in unsere Studie aufgenommen, um die antioxidative Wirksamkeit der von uns verwendeten Pharmaka im intestinalen Stromgebiet zu überprüfen.

In der Kontrollgruppe fanden wir einen niedrigen basalen MDA-Gehalt im Darmgewebe, der im weiteren Versuchablauf gering rückläufig war. Wir führen die initial höheren Werte auf das operative Trauma zurück.

In der unbehandelten LPS-Gruppe (Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS) kam es dagegen zu einem signifikanten Anstieg der MDA-Gewebekonzentration nach Induktion der Endotoxinämie (Zeitpunkt 2 h; + 116 %), vereinbar mit dem Vorliegen eines oxidativen Stresses. Die vermehrte ROS-Generation korreliert mit den erhobenen Befunden einer

vermehrten Leukozytenadhärenz im Intestinum und einer extensiven systemischen Zytokinfreisetzung. Zum Zeitpunkt 4 h waren die MDA-Werte rückläufig, jedoch noch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

In der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS beobachteten wir ebenfalls einen signifikanten Anstieg der MDA-Gewebekonzentration in der unbehandelten LPS-Gruppe. Der Anstieg fiel mit 40 % jedoch geringer aus, als in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. Da in beiden Versuchsreihen – ähnlich der TNF- α -Kinetik – am Ende des Beobachtungszeitraums rückläufige Werte gemessen wurden, lässt sich auch bei diesem Parameter unter erhöhter Endotoxinbelastung ein vorgezogener Peak vermuten. Engmaschigere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Hypothese zu unterstützen. Als weitere Erklärung kommt eine veränderte Konstellation der ROS-generierenden Prozesse bei erhöhter Endotoxinbelastung in Frage. So ist vorstellbar, dass lokale Reperfusionprozesse, die mit einer erhöhten ROS-Produktion einhergehen (Xanthinoxidase-Weg), aufgrund der stärkeren Kreislaufbeeinträchtigung in geringerem Umfang stattfinden. Für diese Hypothese spricht die verminderte funktionelle Kapillardichte in der Muskularis bei erhöhter Endotoxinbelastung.

Yoshikawa et al. [323] bestätigten in ihren Untersuchungen, dass es im Intestinum unter Endotoxinämie zu einer erhöhten Lipidperoxidationsrate kommt. Sie fanden einen Anstieg der TBARS-Konzentration auf 183 % nach Gabe von 100 mg/kg KG LPS im Rattenmodell. In Magen (153 %), Leber (123 %) und Lunge (115 %) war die Lipidperoxidation geringer ausgeprägt. Nur in der Aorta (460 %) wurden höhere Werte gemessen. *Kunimoto et al.* [164] registrierten in der Ratten-Leber nach Gabe von 4 mg/kg KG LPS einen Anstieg der Lipidperoxidkonzentration auf das Doppelte des Ausgangswertes.

In der Versuchsreihe mit einer LPS-Belastung von 5 mg/kg KG konnte durch den Einsatz des Lazaroids U-74389G bzw. Oxypurinol die MDA-Generierung im Intestinum wirksam unterdrückt werden. Damit zeigte sich die antioxidative Wirksamkeit der beiden verwendeten Substanzen. Weil Oxypurinol in Konzentrationen eingesetzt wurde, in denen es neben seiner Wirkung auf den Xanthinoxidase-Stoffwechsel auch unspezifisch antioxidativ wirkt [210], kann über die Hauptradikalquelle nur gemutmaßt werden. Da aber die Leukozytenaktivering (gemessen an der Adhärenz am Endothel) signifikant durch beide Substanzen vermindert wurde, kommt die leukozytäre NADPH-Oxidase als Hauptradikalquelle in Frage. Dafür spricht auch die unveränderte funktionelle Kapillardichte bei niedriger Endotoxinbelastung, was Ischämie-Reperfusionprozesse mit Xanthinoxidase-

induzierter ROS-Produktion zweitrangig erscheinen lässt.

Bei erhöhter Endotoxinbelastung (20 mg/kg KG LPS) war der Effekt der eingesetzten Antioxidantien auf die intestinale MDA-Freisetzung geringer ausgeprägt. Zum Zeitpunkt 2 h waren die MDA-Werte in der Tendenz ansteigend, wenn auch noch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ist beachtenswert, da die MDA-Generation zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS ohnehin schwächer ausgeprägt war. Dadurch wird die These unterstützt, dass zu einem früheren Zeitpunkt eine höhere ROS-Produktion stattgefunden hat. Somit waren die Antioxidantien möglicherweise schon „verbraucht“. Nach vier Stunden wurden dann MDA-Werte wie in der unbehandelten LPS-Gruppe erreicht.

Die Relevanz einer antioxidativen Therapie im Sepsis-Geschehen belegen mehrere experimentelle Arbeiten, die Verbesserungen der Überlebensrate bei den so behandelten Tieren sahen. So zeigten z.B. *Kunimoto et al.* [164] in der oben zitierten Studie (4 mg/kg KG LPS) ein erhöhtes Überleben nach Therapie mit SOD bzw. SOD+Katalase. *McKechnie et al.* [201] fanden nach Gabe von 10 mg/kg KG LPS an der Ratte überlebensverlängernde Effekte von Vitamin E und Phenylbutylnitron. *Hamburger et al.* [117] konnten ein verbessertes Survival nach Gabe von 25 mg/kg KG LPS durch Phenylbutylnitron erreichen (Rattenmodell). In einem CLP-Modell zeigten *Powell et al.* [235] eine Steigerung der Überlebensrate bei Gabe von U-74006F bzw. U-78517F. Vitamin E verlängerte das Überleben nur, wenn es vor Induktion der Sepsis appliziert wurde.

Dass auch beim Menschen antioxidative Parameter einen prognostischen Wert bei Sepsis besitzen, beschrieben z.B. *Warner et al.* [313]. SOD- und Katalase-Aktivitäten unterschieden sich signifikant zwischen Patienten, die eine Sepsis überlebten und Nicht-Überlebenden. Allerdings wiesen die Nicht-Überlebenden höhere Werte der protektiven Enzyme auf. *Borrelli et al.* [38] fanden dagegen signifikant erniedrigte Vitamin-C-Spiegel bei Patienten, die ein Multiorganversagen entwickelten im Gegensatz zu kritisch kranken Patienten, die kein Multiorganversagen entwickelten. *Goode et al.* [101] bestätigten dies für Vitamin A und Vitamin E. Alle zitierten Studien wiesen relativ kleine Fallzahlen auf, so dass die Gültigkeit der Aussagen erst noch an größeren Kollektiven überprüft werden muss. Es ist jedoch denkbar, dass - wie bei anderen Sepsismarkern - ein phasenabhängiges Bild existiert. So könnten anfänglich höhere Werte antioxidativer Parameter einen Hinweis auf die Schwere des primären Insults geben. In einer späteren Phase korrelieren möglicherweise niedrigere

Werte im Sinne einer Anergie mit einer schlechteren Prognose.

Eine überschießende ROS-Bildung erscheint in jedem Falle als nachteilig für den Organismus. Daher wurden klinische Studien mit Antioxidantien, z.B. Vitamin E, Selen, SOD bzw. N-Acetylcystein, initiiert. *Spies et al.* [275] untersuchten den Effekt von N-Acetylcystein auf verschiedene Parameter der Gewebeoxygenierung im septischen Schock. Es stellte sich eine Subgruppe von Patienten (Responder) heraus, in der die untersuchten Parameter sowie das Überleben signifikant verbessert werden konnten. *Gärtner et al.* [89] setzten Natrium-Selenit bei septischen Patienten ein und erzielten bei Patienten mit einem APACHE-Score > 20 eine Reduktion der Mortalität von 70 auf 30 %. Wir konnten in klinischen Studien ebenfalls protektive Effekte auf verschiedene Organfunktionsparameter unter Selensubstitution beobachten [173; 178].

6.6 *Intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss*

Die zur Messung des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses eingesetzte Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) benutzt monochromatisches Licht, das durch eine Halbleiter-Laser-Diode emittiert wird (Methodenübersicht siehe [311]). Das Laserlicht im sichtbaren oder nahen infraroten Bereich gelangt mittels optischer Koppler über eine Faseroptiksonde ins Gewebe. Das in das Gewebe einstrahlende Licht unterliegt der Brechung, Beugung und Reflexion an Grenzstrukturen. Es trifft unter verschiedenen Winkeln auf kleinere und größere Blutgefäße. Die Reflexion erfolgt sowohl an unbewegten (Interstitium, Endothel) als auch bewegten Strukturen (hauptsächlich Erythrozyten). Bei der Reflexion an bewegten Strukturen kommt es infolge der Lageänderung des reflektierenden Objekts zum Detektor zu einer Frequenzverschiebung des monochromatischen Lichts. Dieser Effekt bei Licht- und Schallwellen wurde von dem Physiker *Christian Doppler* (1803-1853) erstmals beschrieben und nach ihm benannt. Das Ausmaß der Frequenzverschiebung ist abhängig von der Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen. Eine Bewegung von 1 mm/s bewirkt eine Frequenzverschiebung von 4 kHz [27]. Das reflektierte Licht kann in der selben Faseroptik zu einem Photodetektor zurückgeleitet werden.

Der resultierende Photostrom beinhaltet eine AC- und eine DC-Komponente. Die AC-Komponente ist abhängig von der Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen und damit vom Blutfluss. Die DC-Komponente, d.h. die Intensität des reflektierten Lichts, korreliert mit

der Teilchendichte im Messvolumen und deren Absorptions- und Reflexionsverhalten. Zwischen beiden Komponenten bestehen enge Wechselwirkungen. Das benutzte Messgerät gibt die Parameter *concentration* (mittlere Konzentration der sich bewegenden Teilchen im Messvolumen) und *speed* (mittlere Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen im Messvolumen) aus. Das Produkt aus *concentration* und *speed* wird vom Messgerät als *flux* angegeben und von uns als intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss (IMBF) bezeichnet.

Der *flux* ist eine relative, richtungslose Messgröße für den mikrovaskulären Blutfluss und wird in Volt oder arbiträren Einheiten angegeben. Das zugrunde liegende Messvolumen ist abhängig von der Geometrie der Sondenspitze. Unterschiedliche Sonden ermöglichen den Einsatz an speziellen Geweben und die Erfassung verschiedener Volumina. Durch die Spezifikationen der von uns benutzten Lasersonde erfassten wir den Summenblutfluss der gesamten Darmwand der Versuchstiere. Es waren relative, jedoch kontinuierliche Aufzeichnungen möglich. Am Intestinum konnte eine akkurate Korrelation der Laser-Doppler-Flowmetrie zur Perfusionsmessung mit der CLGH (Clearance of locally generated hydrogen, [68]) und anderen Methoden [266] gezeigt werden. Die unmittelbare Applikation der Lasersonde an der „region of interest“ und die geringe Eindringtiefe begrenzten bisher die Einsatzfähigkeit der LDF auf Gebiete, die oberflächlich lokalisiert oder nach entsprechender Präparation zugänglich waren. Durch neue Sonden in Nadelform ist heute auch eine invasive Messung in tieferliegenden Schichten möglich [167].

Die LDF eignet sich zur Erfassung von relativen Veränderungen des mikrozirkulatorischen Blutflusses, soweit jene durch Änderungen der Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen hervorgerufen werden (Parameter *speed*). Eine Veränderung der intravasalen (Parameter *concentration*) aber auch der interstitiellen Teilchenkonzentration (Ödem) bewirkt eine unkalkulierbare Fluxänderung. Lineare mathematische Beziehungen für diese Interferenzen existieren nicht. Die LDF kann in diesem Fall zur Messung des mikrovaskulären Blutflusses nur eingeschränkt angewandt werden.

In Vorversuchen mit dem gewählten Studiendesign wurde die intravasale Teilchenkonzentration (Hämatokrit) konstant vorgefunden. Histologisch wurde kein signifikantes Darmwandödem gesehen. Daher müssen die Veränderungen des IMBF direkt durch Veränderungen des Parameters *speed* zustande gekommen sein. Dies wurde in Parallelversuchen überprüft und bestätigt. Damit sind die Blutflussänderungen Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeit zuzuordnen.

Durch die dauerhafte Befestigung der Faseroptik am Gewebe wurde vermieden, Verfälschungen der Messwerte durch eine Erfassung von Blutgefäßen verschiedener Größe

im Messvolumen zu erhalten.

In der Kontrollgruppe fanden wir über den Beobachtungszeitraum einen Trend zu einer Erniedrigung des IMBF. Dies wäre mit dem Trauma durch die operative Präparation (Laparotomie, Sondenanlage) zu erklären. Die Veränderungen waren jedoch nicht signifikant im Vergleich zum Ausgangswert.

Nach Endotoxinbelastung kam es dosisabhängig zu einer signifikanten Reduktion des IMBF. Bei Gabe von 20 mg/kg KG LPS ging der IMBF bis auf 41 % des Ausgangswertes zurück (Zeitpunkt 4 h).

Theuer et al. [291] fanden bei normotensiver Bakteriämie mit der gleichen Methode einen Rückgang des Mukosablutflusses um 40 %. Als Ursache gaben sie eine 30-prozentige Reduktion des Durchmessers der intestinalen A1- und A3-Arteriolen an. Intravitalmikroskopisch konnten *Schmidt et al.* [257] nach Gabe von 15 mg/kg KG LPS eine Reduktion des villösen Blutflusses um 35 % nachweisen (15 % Reduktion des Villusarteriolendurchmessers). *Steeb et al.* [282] registrierten bei experimenteller *E. coli*-Sepsis eine 75-prozentige Reduktion des Blutflusses in prä mukosalen A1-Arteriolen. Berücksichtigt man die normale Verteilung der Durchblutung in der Darmwand von 70 % in der Mukosa und 30 % in der Muskularis [103], so stellen die von uns gemessenen Werte den entsprechenden Durchschnittswert des Blutflusses in der gesamten Darmwand bei Endotoxinämie dar.

Mittels der Mikrosphärentechnik konnten *Xu et al.* [321] zeigen, dass diese Veränderungen für den distalen Dünndarm und den proximalen Dickdarm der Ratte bei experimenteller Endotoxinämie typisch sind, Magen und Duodenum jedoch weniger betroffen sind. In der gleichen Studie fanden sie, dass die Flussreduktion insbesondere durch eine Minderperfusion der Mukosa zu erklären war.

Bereits zitiert wurde die Studie von *Revelly et al.* [241], die eine Umverteilung des Blutflusses bei Endotoxinämie von der Muskularis in die Mukosa beschrieb. Trotzdem kann es aufgrund metabolischer Störungen und Shuntbildung in der Mikrozirkulation (s.u.) zu Mukosaalterationen kommen [303].

Der Gesamtblutfluss in den Darm kann in bestimmten Sepsismodellen (CLP-Modell) sogar zunehmen [193]. Für die tierexperimentelle Endotoxinämie ist jedoch – zumindestens in der Frühphase - eine intestinale Vasokonstriktion und Flussreduktion kennzeichnend. Dies führt zu den auch klinisch beobachteten Störungen, wie der mukosalen Hypoxie und Azidose [125; 300].

Das besonders hohe Risiko der mukosalen Hypoxie resultiert aus der speziellen Mikroanatomie der *Villi intestinales*. Durch die räumliche Nähe zu- und abführender Gefäße in den Darmzotten (Sauerstoffgegenstromprinzip) kommt es in der Villusspitzenregion bei einer Blutflussreduktion besonders rasch zu einem Sauerstoffmangel. Histologisch spiegelt sich das in einem Zottenödem mit nachfolgender Zottenspitzennekrose und Freilegung der Basalmembran wider. Somit geht die natürliche Barriere gegenüber intestinalen Bakterien und deren Toxinen verloren. Dieses als bakterielle Translokation bezeichnete Phänomen bildete die Basis für das Konzept des Darms als Motor des Multiorganversagens [52]. Eine minderperforationsbedingte intestinale Hyperpermeabilität stellt danach einen pathogenetisch bedeutsamen Faktor in der Sepsis dar.

Die Mechanismen, die zur Entwicklung der Endotoxin-induzierten intestinalen Hypoperfusion führen, wurden bereits bei der Diskussion der allgemeinen hämodynamischen Veränderungen (Kapitel 6.1) skizziert. Obwohl die klinische Sepsis – besonders initial - durch ein generelles Überwiegen der Vasodilatation mit konsekutiver Hypotension gekennzeichnet ist, scheint am Darm eine (inadäquate) Vasokonstriktion vorzuherrschen. Die Ursachen sind sowohl auf systemischer (u.a. regulatorischer) als auch lokaler Ebene (z.B. vasokonstriktorische Mediatoren) zu suchen. So ist im Rahmen der Kreislaufzentralisation im (septischen) Schock eine Sympathikus-vermittelte Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet typisch, wenn auch auf Dauer deletär. Systemisch zirkulierende wie lokal freigesetzte vasokonstriktorisch wirksame Mediatoren (z.B. Noradrenalin, Endothelin, Thromboxane) tragen zur intestinalen Hypoperfusion bei. Hinzu kommt die mechanische Obstruktion der Endstrombahn durch das - infolge des Kapillarlecks auftretende - Gewebeödem und die Okklusion durch intravasal einsetzende Gerinnungsprozesse, eine progrediente Leukozytenadhärenz und eine gestörte Fluidität der Erythrozyten. Auch bei scheinbar adäquater Durchblutung, d.h. ausreichend hohem Sauerstoffangebot, kann infolge der Endotoxin-induzierten Sauerstoffverwertungsstörung eine zelluläre Hypoxie auftreten. Unabhängig davon erscheint das Durchbrechen der inadäquaten Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet als eine *conditio sine qua non* zur Protektion der intestinalen Integrität.

Wir untersuchten daher den Einfluss der vasoaktiven Substanzen Iloprost und Dopexamin auf den intestinalen mikrovaskulären Blutfluss bei experimenteller Endotoxinämie. Die Applikation erfolgte kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Dosierung entsprach klinischen Empfehlungen und befand sich im unteren therapeutischen Bereich, um systemische Nebenwirkungen, wie Tachykardie und Hypotension, zu verringern.

Nach Gabe von 5 mg/kg KG LPS kam es unter Dauerinfusion von Iloprost bzw. Dopexamin zu einer Protektion des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses. Es wurden mit der Kontrollgruppe vergleichbare Messwerte erhoben. Im Durchschnitt lagen die IMBF-Werte trotz Endotoxinämie über den Werten der Kontrollgruppe ohne LPS-Belastung. Auch in der Versuchsreihe mit erhöhter Endotoxinbelastung (20 mg/kg KG LPS) konnten die Effekte reproduziert werden. Die IMBF-Werte der beiden Verum-Gruppen lagen signifikant über denen der LPS-Gruppe. Während die mittleren IMBF-Werte in der Dopexamin-Gruppe unverändert über denen der Kontrollgruppe lagen, zeigte sich in der Iloprost-Gruppe eine nicht signifikante Tendenz zu niedrigeren Werten, so dass im direkten Vergleich bei den gewählten Dosierungen Dopexamin als effektivere Substanz erscheint.

Die Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den Resultaten von Studien anderer Autoren, die sich anderer Untersuchungsmethoden bedienten. *Manasia et al.* [189] untersuchten im Schweinemodell den Einfluss von Iloprost auf die Endotoxin-induzierte intestinale Hypoperfusion mittels einer Flussmesssonde an der A. mesenterica superior. Sie beobachteten eine Zunahme des Blutflusses um 37 %. Dies war nicht mit einer Zunahme des Herzzeitvolumens erklärbar. Das Sauerstoffangebot und der pH_i verbesserten sich signifikant. *Hannemann et al.* [119] konnten die Steigerung des Sauerstoffangebots durch Prostacyclingabe bei septischen Patienten bestätigen. *Radermacher et al.* [239] konnten klinisch den pH_i -Anstieg reproduzieren.

Für das Dopexamin wurde, besonders im unteren Dosisbereich (0,5-3 $\mu\text{g/kg/min}$), eine spezifische Steigerung des Blutflusses im Hepatosplanchnikusgebiet postuliert. Dies wird mit dem besonderen Rezeptorprofil (β , DA) erklärt. So fanden *Amenta et al.* [6] eine Zunahme des mesenterialen Blutflusses der gesunden Ratte um 23 % bei Gabe von 1 $\mu\text{g/kg/min}$ Dopexamin und eine Steigerung um 38% bei 3 $\mu\text{g/kg/min}$ Dopexamin. *Brown et al.* [45] zeigten bei gesunden Hunden eine Zunahme des mesenterialen Blutflusses um 20 % bei Applikation von 4,3 $\mu\text{g/kg/min}$ Dopexamin. *Biro et al.* [26] bestätigten die Ergebnisse mit der Mikrosphärentechnik. Bei Endotoxinämie wies die Arbeitsgruppe um *Schmidt et al.* [258] nach, dass die LPS-induzierte mukosale Vasokonstriktion durch Dopexamin-Gabe (2,5 $\mu\text{g/kg/min}$) verhindert werden kann.

Wie bei der Applikation von Iloprost muss ein unspezifischer Effekt auf die

mesenteriale Durchblutung durch eine HZV-Erhöhung abgetrennt werden. *Leier et al.* [179] fanden bei herzinsuffizienten Patienten eine Steigerung von HZV und Hepatosplanchnikusblutfluss um bis zu 40 % bei Gabe von 0,25-1 µg/kg/min Dopexamin, wobei der Effekt auf die Hepatosplanchnikusperfusion bei niedrigeren Dopexamin-Dosierungen stärker ausgeprägt war. In der gleichen Studie konnten sie aber auch zeigen, dass es bei diesem Patientengut durch Dobutamin (7,5 µg/kg/min) bzw. Dopamin (3,85 µg/kg/min) zwar ebenfalls zu einer HZV-Steigerung (+ 20 % bzw. + 10 %) kommt, der Hepatosplanchnikusblutfluss jedoch nicht gesteigert werden konnte. *Maynard et al.* [198] verglichen die Wirkung von 1 µg/kg/min Dopexamin und 2 µg/kg/min Dopamin bei SIRS-Patienten und sahen nur in der Dopexamin-Gruppe einen Effekt auf das Hepatosplanchnikusgebiet, gemessen an pH_i, MEGX-Test und ICG-Clearance. *Smithies et al.* [273] interpretierten ihre Ergebnisse bei Sepsis-Patienten (anhaltender pH_i-Effekt nach Dopexamin-Gabe ohne Korrelation zum Herzzeitvolumen) ebenfalls als preferentielle Wirkung auf das Hepatosplanchnikusgebiet. *Temmesfeld-Wollbrück et al.* [290] fanden eine deutliche Verbesserung der Mukosa-oxygenierung bei nur geringer Beeinflussung des Herzzeitvolumens bei Gabe von 2 µg/kg/min Dopexamin.

Andere Gruppen konnten eine selektive Wirkung von Dopexamin auf den Hepatosplanchnikusblutfluss nicht nachweisen. *Uusaro et al.* [299] zeigten z.B. bei kardiochirurgischen Patienten einen Anstieg des Splanchnikusblutflusses um 43 % nach Gabe von durchschnittlich 1,1 µg/kg/min Dopexamin. Das Herzzeitvolumen stieg dabei um 49 % an. *Bach et al.* [10] fanden bei kardiochirurgischen Patienten vor Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine einen HZV-abhängigen Anstieg der Hepatosplanchnikus-durchblutung (ICG-Methode). Nach der extrakorporalen Zirkulation ließ sich der Zusammenhang jedoch nicht mehr finden.

So muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt offen bleiben, inwieweit die gefundenen Effekte von Dopexamin auf die Hepatosplanchnikusperfusion nur auf eine HZV-Steigerung zurückzuführen sind, oder ob eine selektive Durchblutungssteigerung erzielt werden kann. Im Kontext der tierexperimentellen Befunde erscheint eine selektive Wirkung wahrscheinlich. Der klinische Nachweis lässt sich ungleich schwerer führen, da die Messung der Hepatosplanchnikusperfusion in der Regel nur mit indirekten Methoden möglich ist. Dies gilt gleichermaßen für den Einsatz des stabilen Prostacyclinanalogons Iloprost.

6.7 Powerspektralanalyse

Die Powerspektralanalyse, d.h. die Untersuchung der Frequenzanteile biologischer Signale (z. B. Herzfrequenz, Blutdruck) ist eine relativ junge Methode. Erst durch die rapide Entwicklung der Rechentechnik hat sie eine weite Verbreitung in der Medizin gefunden [224]. Dabei ist das Vorhandensein rhythmischer Oszillationen verschiedener Frequenz in biologischen Signalen bereits sehr lange bekannt. Atemabhängige Schwankungen von Herzfrequenz und Blutdruck wurden 1733 von *Hales* [114] und 1760 durch *von Haller* [310] beschrieben. 1876 beobachtete *Mayer* rhythmische Oszillationen im Blutdruck unterhalb der Atemfrequenz. Er führte dies auf vasomotorische Effekte zurück [197]. Später wurden die gefundenen Frequenzen als *high frequency peak* (HF; 0,15-0,4 Hz, entsprechend der Atemfrequenz beim Menschen), *low frequency peak* (LF; 0,04-0,15 Hz; *Mayer-Wellen*) und *very low frequency*-Bereich (VLF; 0-0,04 Hz) deklariert [289]. Insgesamt ist die Definition von Peakfrequenzen nicht starr zu sehen, da sich unter verschiedenen Bedingungen die charakteristische Frequenz ändern kann. Eine Speziespezifität ist außerdem zu beachten.

Die Frequenzanteile in den biologischen Signalen können mittels zweier verschiedener mathematischer Verfahren differenziert und in einem Powerspektrum dargestellt werden. Die Fast-Fourier-Transformation (FFT) verrechnet das gesamte Signal, unabhängig davon, ob es durch diskrete Schwingungen oder durch breitbandige Anteile gebildet wird. Im Gegensatz dazu wird bei der Autoregressionsanalyse aus den Rohdaten das Spektrum im Sinne eines „best-fitting models“ erstellt. Dabei werden bestimmte Signalanteile als Rauschen identifiziert und im Spektrum unterdrückt. Daraus ergibt sich die besondere Eignung der Autoregressionsanalyse zur Untersuchung diskreter Oszillationen. Werden breitbandige Frequenzanteile vermutet, hat die FFT Vorteile. Wir wählten bei der Berechnung der Autoregressionsanalyse ein Modell höherer Ordnung. Bei höherer Ordnung gleichen sich die Spektren der Autoregressionsanalyse den Spektren der FFT an [224].

Die Zuordnung der im Powerspektrum gefundenen Frequenzanteile zu physiologischen Strukturen und Prozessen wurde in vielen Studien untersucht und ist noch immer Gegenstand der Diskussion. Bereits *Mayer* postulierte Einstellbewegungen der Gefäße (Vasomotion) als Basis für die niederfrequenten Frequenzanteile im Blutdruckspektrum [197]. Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen konnten *Colantuoni et al.* [54] direkte Korrelationen zwischen dem Vasomotionsverhalten einzelner Gefäße (Arteriolen,

Venolen) und Anteilen des lokalen Blutfluss-Spektrums, gemessen mit der Laser-Doppler-Flowmetrie, herstellen. Da die Herzfrequenz maßgeblich über den Vagus und Sympathikus reguliert wird, wurden die spektralen Anteile der Herzfrequenzvariabilität zum Teil dem autonomen Nervensystem zugeschrieben.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die rhythmischen Schwankungen von Blutdruck, Gefäßdurchmesser (Vasomotion), Herzfrequenz (Herzfrequenzvariabilität), lokalen Blutflussparametern (z.B. LDF-Fluxmotion) u.a. physiologischen Signalen im Frequenzbereich < 1 Hz vorwiegend Regulationsprozesse des autonomen Nervensystems widerspiegeln. Aber auch andere Systeme, wie das Renin-Angiotensin-System oder das NO-System, haben Einfluss auf das Powerspektrum in diesem Frequenzbereich [150; 280].

Die mittels verschiedener Blockadeversuche nachgewiesene Korrelation der spektralen LF- und HF-Power mit dem Aktivierungszustand des autonomen Nervensystems haben zu einer weiten Verwendung des LF/HF-Quotienten als Marker der sympathovagalen Balance geführt. So kann durch eine pharmakologische oder chirurgische Sympathikusblockade der LF-Anteil des Powerspektrums signifikant reduziert werden, während der HF-Bereich weitgehend unbeeinflusst bleibt [108; 222; 224]. Eine experimentelle Sympathikus-Aktivierung führte zu einer Steigerung der LF-Power [222]. Die Gabe des Parasympathikolytikums Atropin führte zu einer deutlichen Reduktion der HF-Power [224].

Eckberg fasste die wesentlichen Kritikpunkte an der Zuordnung von LF- und HF-Bereich zu Sympathikus- und Vagus-Aktivität zusammen [70]. So wird bei hochdosierter Atropingabe auch der LF-Bereich verändert. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die HF-Power von der Sympathikus-Aktivität mit beeinflusst wird. *Stauss et al.* [281] konnten in der Kohärenzanalyse keine konstante Korrelation zwischen LF-Power und Sympathikus-Aktivität finden. Trotz der genannten Einschränkungen repräsentieren LF- und HF-Power nach *Goldberger* den Summeneffekt verschiedener Einwirkungen auf das autonome Nervensystem [95].

Ist die Bedeutung der Frequenzanteile von Blutdruck und Herzfrequenz noch Gegenstand intensiver Diskussion, so gibt es zur Powerspektralanalyse des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses keine vergleichbare Literatur. Insbesondere Veränderungen des IMBF-Powerspektrums unter Endotoxinämie sind bisher nicht beschrieben. Deshalb untersuchten wir in Vorstudien mittels pharmakologischer bzw. chirurgischer Blockadetechniken die RR- und IMBF-Powerspektren in unserem Versuchstiermodell.

Zunächst stellten wir fest, dass die im Blutdruck-Spektrum beschriebenen

Frequenzpeaks auch im IMBF-Spektrum aufzufinden waren. Die dominierende Frequenz im LF-Bereich lag bei 0,4 Hz und im HF-Bereich bei 1,2 - 1,4 Hz. Dies entspricht den Angaben in der Literatur für die Spezies Ratte [148]. Wir konnten zeigen, dass sich die dominierenden Frequenzen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von vier Stunden nicht änderten. Die Gabe von 5 mg/kg KG LPS bewirkte keine Verlagerung der dominierenden Frequenzen in den ausgewerteten Frequenzbändern. Die dominierenden Frequenzen und die HF-Power waren über den Versuchszeitraum wie in der Kontrollgruppe konstant.

Wir beobachteten jedoch eine signifikante Zunahme der LF-Power nach Induktion der Endotoxinämie mit 20 mg/kg KG LPS, sowohl im Blutdruck- als auch im IMBF-Spektrum. Eine pharmakologische Blockade des Sympathikotonus mittels Clonidin verhinderte nahezu vollständig den Anstieg der LF-Power im Spektrum von Blutdruck und IMBF. Dies belegt einen maßgeblichen Einfluss des Sympathikus auf die Spektralveränderungen. Eine Reduktion der spektralen Power im LF-Bereich nach Clonidin-Applikation beschrieben auch *Grichois et al.* [108]. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse der Arbeitsgruppe *Golubinskaya et al.*, die weder bei Prazosin-, noch bei Atropin-Gabe eine Blockade der LF-Power im mesenterialen Blutdruckspektrum finden konnten [99].

In einer weiteren Versuchsreihe führten wir eine chirurgische Denervierung des Sympathikus im Splanchnikusgebiet durch. Danach registrierten wir eine deutliche Zunahme des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses bei stabilen Kreislaufverhältnissen. Der intestinale Gefäßwiderstand war signifikant reduziert. Im IMBF-Spektrum war im Gegensatz zu den Clonidinversuchen wiederum ein signifikanter Anstieg der LF-Power nach Induktion der Endotoxinämie sichtbar. Auch im RR-Spektrum trat der LF-Peak wieder auf. Offensichtlich wurden makrohämodynamische Oszillationen druck-passiv auf die intestinale Mikrozirkulation übertragen. Neben der zentralen Sympathikuswirkung können andere Organsysteme, wie z.B. die renale Zirkulation, für die Genese der fortgeleiteten Oszillationen verantwortlich sein [2].

Das unterschiedliche Verhalten der LF-Power bei systemischer Inhibition des Sympathikus mit Clonidin und bei lokaler chirurgischer Sympathektomie (Durchtrennung des *N. splanchnicus major*) lässt sich dadurch erklären, dass im Falle von Clonidin der sympathische Einfluss auf die gesamte Zirkulation des Organismus blockiert wird, während im Falle der lokalen Sympathektomie lediglich der sympathische Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt unterbunden wird. Systemische Einflüsse des Sympathikus können sich also nach wie vor „druck-passiv“ auf die intestinale Mikrozirkulation übertragen. Dies ist nach systemischer Sympathikolyse mit Clonidin natürlich nicht möglich.

In den Vorversuchen mit Applikation von 5 mg/kg KG LPS zeichnete sich bereits ein Trend zu einem biphasischen Verhalten der Veränderungen im LF-Bereich ab. In den Hauptversuchen bestätigte sich der Trend, erreichte in der niedrigen Endotoxindosierung jedoch keine statistische Signifikanz. Der HF-Bereich blieb in den Vorversuchen und in den Hauptversuchen konstant.

Bei Gabe von 20 mg/kg KG LPS war nach zwei Stunden Endotoxinämie sowohl im Blutdruck als auch im IMBF-Spektrum ein signifikanter Anstieg der Power im LF-Bereich zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Rückgang der LF-Power in den Bereich der Ausgangswerte. Die HF-Power blieb wiederum konstant.

Das biphasische Verhalten der LF-Power nach Endotoxinapplikation ist aus tierexperimentellen Studien bekannt. *Goldstein* et al. [96] beobachteten in einem Endotoxinmodell am Kaninchen kurz nach Endotoxingabe einen drastischen Anstieg der Power im LF-Bereich des Herzfrequenzspektrums. Danach gingen die Werte signifikant in den Ausgangsbereich zurück. In den Experimenten stellte sich jedoch eine schwere Hypotension ein, so dass bei der Interpretation der Veränderungen im LF-Bereich eine Dekompensation der initialen Sympathikus-Aktivierung angenommen wurde. Da keine Veränderungen der Plasma-Katecholaminspiegel gefunden wurden, gingen die Autoren von einer direkten Reaktion des autonomen Nervensystems ohne neurohumorale Beteiligung aus. Andere Autoren sahen jedoch in der frühen, hyperdynamen Phase nach Endotoxin-Applikation auch signifikant erhöhte Katecholaminspiegel [124].

In unseren Versuchen kam es erst nach zwei Stunden Endotoxinämie zu einem Anstieg der LF-Power. Ein früherer Anstieg, unmittelbar nach Endotoxinapplikation, konnte durch die Wahl der Messzeitpunkte nicht erfasst werden. Der späte Anstieg der LF-Power in der Versuchsreihe mit der erhöhten Endotoxinbelastung korrelierte mit der zu diesem Zeitpunkt beginnenden, milden Hypotension. In nichtseptischen Settings, wie der leichten Hämorrhagie, findet man ähnliche, inverse Reaktionen von Blutdruck und LF-Power als Indikator für eine zunehmende Sympathikus-Aktivierung [297].

Von *Young* und *Cameron* wurde an der Haut septischer Patienten mit der LDF eine Zunahme der spektralen Power im LF-Frequenzband gefunden [325]. Eine Sympathikolyse konnte den LF-Anstieg nicht supprimieren. Die Autoren werteten dies als Zeichen der abgeschwächten zentralen und verstärkten peripheren Kontrolle des Hautblutflusses in der Sepsis. Der Anstieg der LF-Power in unserer Studie war jedoch von einer Abnahme des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses gekennzeichnet, während *Young* und *Cameron* eine Zunahme der Hautperfusion bei den septischen Patienten beobachteten.

Der Rückgang der LF-Power nach vier Stunden spricht für eine progrediente Dekompensation der vegetativen Aktivierung, wie sie in mehreren Studien an endotoxämischen Versuchstieren und septischen Patienten beschrieben wurde [94; 96; 232]. Wir werten die Abnahme der LF-Power-Werte auf das Ausgangsniveau nicht als Normalisierung des Zustandes der Versuchstiere, da der intestinale mikrovaskuläre Blutfluss in diesem Zeitraum weiter abfiel.

Als Ursachen für das progrediente Versagen des autonomen Nervensystems bei Endotoxinämie kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Zum einen ist eine Beeinträchtigung zentraler α_1 -Rezeptoren nach Endotoxin-Applikation bekannt [96]. Zusätzlich kommt es durch die erhöhten endogenen Katecholaminspiegel zu einer Downregulation der β -Rezeptoren [56]. Desweiteren werden auch Störungen des arteriellen Barorezeptorenreflexes, der wesentlich das Powerspektrum beeinflusst, bei Sepsis beschrieben [96].

Wir überprüften die Veränderungen von RR- und IMBF-Spektrum bei Endotoxinämie während der Applikation von Iloprost und Dopexamin.

In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS waren die Spektren – wie in der unbehandelten LPS-Gruppe – nicht signifikant unterschiedlich zur Kontroll-Gruppe.

Nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS konnte durch die Iloprost- und Dopexamin-Gabe der Anstieg der Power im LF-Bereich vermieden werden. Im Gegensatz zur unbehandelten LPS-Gruppe wiesen die Tiere der beiden Behandlungsgruppen zu diesem Zeitpunkt ein stabiles Blutdruckverhalten und einen signifikant erhöhten IMBF auf. Dies könnte zum Teil das unbeeinträchtigte Powerspektrum erklären. Im Kontext der in den Laboruntersuchungen und der Intravitalmikroskopie erhobenen Befunde war die Beeinträchtigung der Versuchstiere durch die Endotoxinämie deutlich abgeschwächt.

Für Iloprost ist ein günstiger Einfluss auf die Vasomotion bekannt. *Jünger et al.* [137] beobachteten die Restitution einer gestörten Vasomotion durch die Dilatation präkapillärer Arteriolen nach Iloprost-Gabe. *Bihari et al.* [25] fanden dies in LDF-Untersuchungen an der Haut bestätigt. Es werden auch direkte, inhibitorische Interaktionen von Iloprost mit der sympathischen Neurotransmission angenommen [106].

Unter β -Mimetika-Therapie ist ein Anstieg der Power im LF-Bereich als Ausdruck einer Sympathikus-Aktivierung beschrieben [97]. *Bass et al.* [15] wiesen eine signifikante Aktivierung des Barorezeptorenreflexes bei Dopexamininfusion nach. Obwohl die durchschnittliche LF-Power in der Dopexamin-Gruppe über den Werten der Iloprost-Gruppe lag, war dies in unseren Experimenten nicht signifikant. Es überwog der

kreislaufstabilisierende Effekt (signifikante Reduktion der LF-Power gegenüber der unbehandelten LPS-Gruppe). *Heinroth* et al. [127] fanden keine Unterschiede in der Herzfrequenzvariabilität zwischen kritisch kranken Patienten mit niedrigem und hohem Katecholaminbedarf.

Zur Beurteilung der spektralen Veränderungen in unseren Versuchsreihen muss der Einfluss der Narkose berücksichtigt werden [72; 131; 251]. *Mazerolles* et al. [200] gaben für das von uns verwendete Pentobarbital eine Reduktion der Power im LF- und HF-Bereich des Blutdruck-Spektrums von 30 % an. *Huang* et al. [132] beobachteten unter Narkose (Thiopental, Fentanyl, Droperidol, Suxamethonium) beim Menschen einen Rückgang der LF- und HF-Power auf ca. ein Zehntel des Ausgangswerts. Der LF-/HF-Quotient blieb somit unverändert.

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Powerspektrum ist die Körpertemperatur. So zeigten *Fleisher* et al. [83], dass insbesondere eine oberflächliche Abkühlung zu einer signifikanten Reduktion der Power im LF- (aber auch im VLF-) Bereich führt. Bei unseren Versuchstieren wurde die Körpertemperatur mittels einer thermostatierten Wärmematte über den gesamten Versuchszeitraum konstant gehalten, so dass dieser Einflussfaktor ausgeschlossen werden konnte.

Bereits hingewiesen wurde auf weitere Regulationssysteme, welche im LF- und HF-Bereich des Powerspektrums einwirken können. Das NO-System spielt im Rahmen von Endotoxinämie und Sepsis eine besondere Rolle. Unter Endotoxineinwirkung kommt es zur Expression der induzierbaren NO-Synthase mit Verstärkung der NO-Produktion. NO puffert die Blutdruck-Variabilität im Bereich von 0,2 – 0,6 Hz bei der Ratte [215]. Damit könnte der Power-Anstieg im LF-Bereich bei Endotoxinämie abgeschwächt werden.

6.8 Vergleichende Bewertung der Teilstudien

Da für die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation eine in allen Gruppen (inklusive Kontrollgruppe) vergleichbare Makrohämodynamik, insbesondere ein stabiler Blutdruck, angestrebt wurde, standen Kreislaufeffekte der eingesetzten Substanzen *a priori* nicht im Vordergrund.

Alle Tiere entwickelten nach Endotoxinapplikation eine kurzzeitige Hypotension mit rascher Erholung und eine persistierende Tachykardie. Dies kann als Effektivitätskriterium für die Endotoxinämie-Induktion gelten und wurde durch die Gabe der antioxidativen bzw.

vasoaktiven Substanzen nicht wesentlich beeinflusst. Zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie waren in allen Gruppen vergleichbare Blutdruckwerte zu verzeichnen.

Bei der Analyse der Blutgasuntersuchungen fiel eine Erholung der pO_2 -Werte nach Narkoseeinleitung in allen Gruppen - bis auf die unbehandelten LPS-Gruppen - auf. Der protektive Effekt der eingesetzten Substanzen war besonders ausgeprägt in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS, jedoch auch signifikant in der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS. Damit erscheint eine Reduktion Endotoxin-bedingter Lungenfunktionsstörungen sowohl durch die eingesetzten antioxidativen als auch die vasoaktiven Substanzen möglich. Die pCO_2 -Werte waren durch die Endotoxin-induzierte Hyperventilation in allen Gruppen leicht erniedrigt. Ein Effekt der eingesetzten Substanzen ließ sich an diesem Parameter nicht nachweisen. Der pH-Wert befand sich in allen Versuchsgruppen im Normbereich.

Die Laktatwerte stiegen im Beobachtungszeitraum in allen Gruppen mit Endotoxinämie (5 bzw. 20 mg/kg KG LPS) an. Lediglich die Behandlung mit U-743890G führte zu signifikant niedrigeren Werten in der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS. Die anderen Substanzen hatten in beiden Versuchsreihen keinen Einfluss auf die Hyperlaktatämie. In Anbetracht des stabilen pH-Wertes und der verbesserten Mikrozirkulationsparameter nach Applikation der antioxidativen bzw. vasoaktiven Substanzen erscheint eine Perfusionsstörung für die Hyperlaktatämie nicht hauptsächlich verantwortlich gewesen zu sein. Endotoxin-spezifische Stoffwechselveränderungen kommen eher als Ursache in Frage.

Obwohl die Leukopenie im peripheren Blutbild durch die untersuchten Substanzen nicht beeinflusst wurde, zeigt sich jedoch in der intestinalen Mikrozirkulation eine signifikant verminderte Leukozytenadhärenz, insbesondere in den submukösen V1-Venolen. Dies erscheint im Hinblick auf die pathogenetische Rolle des Intestinums bei der Entwicklung des septischen Multiorganversagens von wesentlicher Bedeutung. Das Risiko einer Störung der intestinalen Integrität (vor allem der Mukosabarriere) durch die deletären Leukozytenwirkungen in der Mikrozirkulation und damit die Möglichkeit des Übertritts von Bakterien und Toxinen aus dem Darmlumen in die Zirkulation kann offensichtlich durch die Gabe von Antioxidantien oder vasoaktiven, perfusionssteigernden Substanzen verringert werden.

Der Effekt der antioxidativen Substanzen war dabei deutlich stärker ausgeprägt, als der von Iloprost bzw. Dopexamin. Das 21-Aminosteroid U-74389G zeigte in beiden Endotoxin-Dosierungen den stärksten Effekt auf die Leukozytenadhärenz. Wir interpretieren

den besonderen Benefit durch die Antioxidantien mit ihrer direkten Wirkung auf einen terminalen Mediator der Gewebeschädigung – die reaktiven Sauerstoffspezies. Dafür spricht auch die höhere Effektivität des Radikalfängers U-74389G im Vergleich zum Oxypurinol, das vorwiegend auf die Entstehung von Radikalen aus einem Stoffwechselweg (Xanthinoxidase) wirkt. Der positive Effekt der Perfusionssteigerung durch die vasoaktiven Substanzen, bewiesen durch die IMBF-Messungen, kann theoretisch durch einen Reperfusionsschaden limitiert worden sein.

Die Kapillarperfusion war bei niedriger Endotoxinbelastung (5 mg/kg KG LPS) kaum verändert. Erst nach Gabe von 20 mg/kg KG LPS traten signifikante Perfusionsausfälle auf, die durch Dopexamin-, aber auch Oxypurinol-Gabe abgemildert werden konnten.

Der protektive Effekt des Dopexamins korrelierte mit der Verbesserung des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses, gemessen mit der Laser-Doppler-Flowmetrie. Hier zeigte auch das Iloprost einen positiven Effekt. Beide vasoaktiven Substanzen normalisierten das Blutdruck- und IMBF-Spektrum in der Versuchsreihe mit 20 mg/kg KG LPS.

Bezüglich der TNF- α -Freisetzung konnten wir sowohl durch die Gabe antioxidativer als auch vasoaktiver Substanzen eine signifikante Reduktion der Spitzenspiegel erzielen. In der Versuchsreihe mit 5 mg/kg KG LPS war eine durchschnittliche Verminderung des TNF- α -Peaks um 60 % zu verzeichnen. Den größten Effekt hatte Dopexamin mit 61 %. Bei höherer Endotoxin-Belastung (20 mg/kg KG LPS) war ebenfalls Dopexamin am wirksamsten.

Die verminderte TNF- α -Freisetzung in der Teilstudie 1 mit Einsatz von U-74389G bzw. Oxypurinol korrelierte mit einer verminderten MDA-Freisetzung als Parameter für eine Reduktion der radikalinduzierten Lipidperoxidation.

Die Ergebnisse beider Teilstudien zeigten, dass sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch eine inadäquate Perfusion in der Mikrozirkulation wesentliche pathogenetische Faktoren bei Endotoxinämie bzw. Sepsis darstellen. Zwischen beiden Pathomechanismen gibt es vielfältige Verknüpfungen. So entstehen durch wiederholte Ischämie-Reperfusions-Prozesse infolge von Endotoxinämie-assoziierten Perfusionsstörungen verstärkt Sauerstoffradikale. Andererseits wirken die Sauerstoffradikale auf den Gefäßtonus ein [158; 330; 333].

Wegen der genannten Wechselwirkungen können die Medikamenteneffekte ebenfalls nicht isoliert betrachtet werden. Bezüglich der antioxidativen Substanzen muss für die

vorgelegte Arbeit als Einschränkung gelten, dass es sich um ein Pretreatment-Design handelte und so der Effekt im Posttreatment-Modell zu überprüfen ist. Bisher vorliegende Studien mit Antioxidantien-Applikation nach LPS-Gabe konnten aber für bestimmte Substanzen (z.B. SOD, U-7400F, U-78517F) protektive Wirkungen nachweisen [235; 260; 265; 314].

7 Zusammenfassung

Die Letalität der Sepsis und des konsekutiven Multiorganversagens ist trotz der Fortschritte der Medizin in den letzten Jahren nahezu unverändert hoch. Es handelt sich um die häufigste Todesursache kritisch kranker Patienten auf operativen Intensivstationen. Die Störung der intestinalen Mikrozirkulation gilt als ein kardinaler Mechanismus für die Entwicklung des Multiorganversagens. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss verschiedener, potentiell protektiver Substanzen auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung zu evaluieren.

Die Auswahl der Substanzen orientierte sich an zwei wesentlichen Prinzipien der Sepsis-Therapie: der supportiven Behandlung von Organdysfunktionen und der Antagonisierung von schädigenden Mediatoren. In der Klinik werden diese Strategien mit den Maßnahmen zur Herdsanierung und der Antibiotikatherapie kombiniert eingesetzt.

Das septische Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom ist durch schwerwiegende Perfusionsstörungen auf Mikrozirkulationsebene gekennzeichnet. Daher wählten wir zwei, bereits klinisch verfügbare, vasoaktive Substanzen (Iloprost, Dopexamin) zur Verbesserung der intestinalen Perfusion aus.

Die Mediatorenantagonisierung stellt eine neuartige Säule der Sepsis-Behandlung dar. Wir wählten zwei experimentelle Antioxidantien (Lazaroid U-74389G, Oxypurinol) mit dem Ziel der Antagonisierung der als terminale Mediatoren fungierenden, reaktiven Sauerstoffspezies.

Da das Intestinum für mikrozirkulatorische Studien klinisch kaum zugänglich ist, wurden mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission die Auswirkungen einer Therapie mit den antioxidativen Substanzen Oxypurinol und U-74389G bzw. den vasoaktiven Substanzen Iloprost und Dopexamin auf die intestinale Mikrozirkulation und die systemische Mediatorfreisetzung in einem Tiermodell mit moderater und hoher Endotoxin-Belastung (5 bzw. 20 mg/kg KG LPS) untersucht. Zu diesem Zweck wurden innovative Methoden etabliert und eingesetzt.

Die Untersuchung der intestinalen Mikrozirkulation erfolgte mittels der intravitalen

Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurde die funktionelle Kapillardichte als Parameter für die Integrität der Kapillarperfusion und das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der submukösen Venolen als Maß für die Leukozytenaktivierung bestimmt.

Als primärer Mediator im septischen Geschehen wurde der Tumornekrosefaktor- α im Serum analysiert. Als Marker für die Wirkung freier Sauerstoffradikale wurde in der Teilstudie 1 (antioxidative Substanzen) das Lipidperoxidaionsprodukt Malondialdehyd im Darmgewebe bestimmt. In der Teilstudie 2 (vasoaktive Substanzen) wurde die Perfusion der Darmwand (intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss) mittels der Laser-Doppler-Flowmetrie untersucht. Zusätzlich wurden Powerspektralanalysen des systemischen Blutdrucks und des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses durchgeführt, um Informationen über Regulationsprozesse im Bereich des autonomen Nervensystems bei Endotoxinämie und vasoaktiver Therapie zu erhalten.

Die intravitalmikroskopischen Ergebnisse erbrachten eine Verbesserung der Kapillarperfusion bei Endotoxinämie in der Muskularisschicht durch Oxypurinol und Dopexamin, in der Mukosa durch Iloprost. Die Endotoxin-induzierte, intestinale Leukozytenadhärenz wurde insbesondere durch die Behandlung mit antioxidativen Substanzen vermindert. Signifikante Ergebnisse erzielte aber auch die Therapie mit vasoaktiven Substanzen.

Beide therapeutischen Optionen bewirkten eine ca. 60 %ige Reduktion der initialen TNF- α -Freisetzung in der Versuchsreihe mit der niedrigeren LPS-Dosis. Parallel dazu konnte anhand der MDA-Analysen gezeigt werden, dass Oxypurinol und U-74389G wirksam die intestinale, Radikal-induzierte Lipidperoxidation verringerten. Eine Verflechtung von Radikal- und Zytokinproduktion erscheint möglich.

Der intestinale mikrovaskuläre Blutfluss (IMBF) konnte durch beide vasoaktiven Substanzen - sowohl bei moderater als auch bei erhöhter Endotoxin-Dosierung - signifikant gesteigert werden. Die bei höherer Endotoxin-Belastung festzustellenden Veränderungen im RR- und IMBF-Powerspektrum konnten durch Iloprost- bzw. Dopexamin inhibiert werden. Dies spricht für eine geringere Aktivierung des vegetativen Nervensystems.

Die Ergebnisse beider Teilstudien bestätigten, dass sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch eine inadäquate Perfusion in der Mikrozirkulation wesentliche pathogenetische Faktoren bei Endotoxinämie bzw. Sepsis darstellen und entsprechende Therapieformen

indiziert und effektiv sind.

Obwohl auch bei erhöhter Endotoxin-Belastung eine signifikante Verbesserung des intestinalen mikrovaskulären Blutflusses durch den Einsatz der vasoaktiven Substanzen erzielt werden konnte, bewirkten hier die antioxidativen Substanzen, insbesondere das Lazaroid U-74389G, eine stärkere Inhibition der Leukozytenadhärenz in der Darmwand. Der limitierte Effekt der vasoaktiven Substanzen könnte mit ROS-generierenden Reperfusionprozessen im Zusammenhang stehen. Eine kombinierte Gabe beider Substanzklassen erscheint daher sinnvoll und sollte in weiteren tierexperimentellen und klinischen Studien evaluiert werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R (1995) Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 273:934-941.
2. Abu A, I, Ajikobi DO, Bachelard H, Cupples WA, Salevsky FC (1998) Responses of mesenteric and renal blood flow dynamics to acute denervation in anesthetized rats. *Am J Physiol* 275:R1543-R1552.
3. Adam D, Gerlach B (1994) Antibacterial Treatment of Sepsis. In: Reinhart K, Eyrich K (eds): Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 247-255.
4. Ahrenholz DH, Simmons RL (1980) Fibrin in peritonitis. I. Beneficial and adverse effects of fibrin in experimental *E. coli* peritonitis. *Surgery* 88:41-47.
5. Albrecht M, Clowes GHA (1964) The increase of circulatory requirements in the presence of inflammation. *Surgery* 56:158-160.
6. Amenta F, Ricci A, Napoleone P, Vyas SJ, Lokhandwala MF (1991) Anatomical localization of the binding and functional characterization of responses to dopexamine hydrochloride in the rat mesenteric vasculature. *Pharmacology* 42:211-222.
7. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb PK, Harrington D, Kox WJ, Poole WP, Coats AJ (1997) Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349:1050-1053.
8. Arvidsson S, Falt K, Marklund S, Haglund U (1985) Role of free oxygen radicals in the development of gastrointestinal mucosal damage in *Escherichia coli* sepsis. *Circ Shock* 16:383-393.
9. Baatz H, Pleyer U, Thiel HJ, Hammer C (1995) In Vivo Study of Leukocyte-Endothelium Interaction in Endotoxin-Induced Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1960-1967.
10. Bach F, Silomon M, Grundmann U, Stürner J, Graeter T, Larsen R (1999) Splanchnikusperfusion unter Dopexamin bei kardiochirurgischen Eingriffen. *Anaesthesist* 48:713-717.

11. Bahrami S, Redl H, Leichtfried G, Yu Y, Schlag G (1994) Similar cytokine but different coagulation responses to lipopolysaccharide injection in D-galactosamine-sensitized versus nonsensitized rats. *Infect Immun* 62:99-105.
12. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD (1988) Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 28:896-906.
13. Baron P, Traber LD, Traber DL, Nguyen T, Hollyoak M, Heggers JP, Herndon DN (1994) Gut failure and translocation following burn and sepsis. *J Surg Res* 57:197-204.
14. Barroso Aranda J, Schmid Schonbein GW, Zweifach BW, Mathison JC (1991) Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* 69:1196-1206.
15. Bass AS, Kohli JD, Lubbers N, Goldberg LI (1987) Mechanisms mediating the positive inotropic and chronotropic changes induced by dopexamine in the anesthetized dog. *J Pharmacol Exp Ther* 242:940-944.
16. Baue AE (1975) Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch Surg* 110:779-781.
17. Baumann G, Felix SB, Filcek SA (1990) Usefulness of dopexamine hydrochloride versus dobutamine in chronic congestive heart failure and effects on hemodynamics and urine output. *Am J Cardiol* 65:748-754.
18. Baumann G, Hader O (1996) Pharmakotherapie der schweren Herzinsuffizienz mit Inodilatoren - Neue Ansätze. *Z Kardiologie* 85 Suppl 4:9-19.
19. Bautista AP, Spitzer JJ (1990) Superoxide anion generation by in situ perfused rat liver: effect of in vivo endotoxin. *Am J Physiol* 259:G907-12.
20. Bazil V, Strominger JL (1991) Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* 147:1567-1574.
21. Benninghoff A, Goerttler K (1979) *Lehrbuch der Anatomie des Menschen*. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 111.
22. Berendes E, Mollhoff T, Van-Aken H, Schmidt C, Erren M, Deng MC, Weyand M, Loick HM (1997) Effects of dopexamine on creatinine clearance, systemic inflammation, and splanchnic oxygenation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Anesth Analg* 84:950-957.
23. Bessey PQ, Watters JM, Aoki TT, Wilmore DW (1984) Combined hormonal infusion simulates the metabolic response to injury. *Ann Surg* 200:264-281.
24. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone-MA J, Seed B (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory

proteins and lectins. *Science* 243:1160-1165.

25. Bihari DJ, Tinker J (1988) The therapeutic value of vasodilator prostaglandins in multiple organ failure associated with sepsis. *Intensive Care Med* 15:2-7.
26. Biro GP, Douglas JR, Keon WJ, Taichman GC (1988) Changes in regional blood flow distribution induced by infusions of dopexamine hydrochloride or dobutamine in anesthetized dogs. *Am J Cardiol* 62:30C-36C.
27. Boggett D, Blond J, Rolfe P (1985) Laser Doppler measurements of blood flow in skin tissue. *J Biomed Eng* 7:225-232.
28. Bohlen HG, Gore RW (1976) Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res* 11:103-110.
29. Boillot A, Massol J, Maupoil V, Grelier R, Bernard B, Capellier G, Berthelot A, Barale F (1997) Myocardial and vascular adrenergic alterations in a rat model of endotoxin shock: reversal by an anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody. *Crit Care Med* 25:504-511.
30. Bone RC (1991) Let's agree on terminology: definitions of sepsis. *Crit Care Med* 19:973-976.
31. Bone RC (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115:457-469.
32. Bone RC (1996) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24:1125-1128.
33. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-1655.
34. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA (1997) Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112:235-243.
35. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 20:724-726.
36. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD (1989) PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73:1109-1112.
37. Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K (1998) Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 114:103-114.
38. Borrelli E, Roux LP, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM (1996) Plasma

concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 24:392-397.

39. Bourke WJ, O'Connor CM, FitzGerald MX, McDonnell TJ (1994) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces pulmonary endothelial cytotoxicity: protection by dibutyryl-cAMP. *Eur Respir J* 7:1754-1758.
40. Bouvier C, Guc MO, Furman BL, Parratt JR (1994) Platelet activating factor impairs pressor responses to noradrenaline in the anaesthetized rat but does not mediate endotoxin-induced hyporeactivity. *Circ Shock* 42:14-19.
41. Brackett DJ, Lerner MR, Wilson MF (1991) Dimethyl sulfoxide antagonizes hypotensive, metabolic, and pathologic responses induced by endotoxin. *Circ Shock* 33:156-163.
42. Brackett DJ, Schaefer CF, Tompkins P, Fagraeus L, Peters LJ, Wilson MF (1985) Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. *Circ Shock* 17:273-284.
43. Braugher JM, Chase RL, Neff GL, Yonkers PA, Day JS, Hall ED, Sethy VH, Lahti RA (1988) A new 21-aminosteroid antioxidant lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotropin secretion and blocks arachidonic acid release from mouse pituitary tumor (AtT-20) cells. *J Pharmacol Exp Ther* 244:423-427.
44. Brown RA, Dixon J, Farmer JB, Hall JC, Humphries RG, Ince F, O'Connor SE, Simpson WT, Smith GW (1985) Dopexamine: a novel agonist at peripheral dopamine receptors and beta 2-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 85:599-608.
45. Brown RA, Farmer JB, Hall JC, Humphries RG, O'Connor SE, Smith GW (1985) The effects of dopexamine on the cardiovascular system of the dog. *Br J Pharmacol* 85:609-619.
46. Browne MK, Leslie GB (1976) Animal models of peritonitis. *Surg Gynecol Obstet* 143:738-740.
47. Bruin KF, von der Möhlen MAM, van Deventer DJH (1994) Endotoxemia and Sepsis: Important Roles for Lipopolysaccharide Binding Protein and CD14 in Endotoxin Signal transduction. In: Reinhart K, Eyrich K (eds): *Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 53-60.
48. Brun BC, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B (1995) Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 274:968-974.

-
49. Bryant RE, Sutcliffe MC (1974) The effect of 3',5'-adenosine monophosphate on granulocyte adhesion. *J Clin Invest* 54:1241-1244.
 50. Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1982) First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2:A 327-A 327.
 51. Cady-LD J, Weil MH, Afifi AA, Michaels SF, Liu VY, Shubin H (1973) Quantitation of severity of critical illness with special reference to blood lactate. *Crit Care Med* 1:75-80.
 52. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV (1986) Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg* 121:196-208.
 53. Clapp LH, Turcato S, Hall S, Baloch M (1998) Evidence that Ca^{2+} -activated K^{+} channels play a major role in mediating the vascular effects of iloprost and cicaprost. *Eur J Pharmacol* 356:215-224.
 54. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M (1994) Microvascular vasomotion: origin of laser Doppler flux motion. *Int J Microcirc Clin Exp* 14:151-158.
 55. Cook DJ, Sibbald WJ, Vincent JL, Cerra FB (1996) Evidence based critical care medicine; what is it and what can it do for us? Evidence Based Medicine in Critical Care Group. *Crit Care Med* 24:334-337.
 56. Cryer PE (1980) Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N Engl J Med* 303:436-444.
 57. Curtis SE, Cain SM (1992) Regional and systemic oxygen delivery/uptake relations and lactate flux in hyperdynamic, endotoxin-treated dogs. *Am Rev Respir Dis* 145:348-354.
 58. D'Acquisto F, Sautebin L, Iuvone T, Di-Rosa M, Carnuccio R (1998) Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in J774 macrophages. *FEBS Lett* 440:76-80.
 59. Dahn MS, Lange MP, Wilson RF, Jacobs LA, Mitchell RA (1990) Hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption measurements in clinical sepsis. *Surgery* 107:295-301.
 60. Dahn MS, Lange P, Lobdell K, Hans B, Jacobs LA, Mitchell RA (1987) Splanchnic and total body oxygen consumption differences in septic and injured patients. *Surgery* 101:69-80.
 61. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE (1991) Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 99:169-175.
 62. de Carvalho H, Matos JA, Bouskela E, Svensjo E (1999) Vascular permeability increase and plasma volume loss induced by endotoxin was attenuated by hypertonic saline with or without dextran. *Shock* 12:75-80.
 63. Deitch EA (1992) Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future

therapy. *Ann Surg* 216:117-134.

64. Deitch EA, Ma L, Ma WJ, Grisham MB, Granger DN, Specian RD, Berg RD (1989) Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. *J Clin Invest* 84:36-42.

65. Deitch EA, Specian RD, Berg RD (1991) Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med* 19:785-791.

66. Dentener MA, Bazil V, Von-Asmuth EJ, Ceska M, Buurman WA (1993) Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 150:2885-2891.

67. Dhainaut JF, Vincent JL, Richard C, Lejeune P, Martin C, Fierobe L, Stephens S, Ney UM, Sopwith M (1995) CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor-alpha: safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD571 Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 23:1461-1469.

68. DiResta GR, Corbally MT, Sigurdson ER, Haumschild D, Ridge R, Brennan MF (1994) Infrared laser Doppler flowmeter in the determination of small bowel perfusion after ischemic injury: comparison with the clearance of locally generated hydrogen and fluorescein angiography. *J Pediatr Surg* 29:1352-1355.

69. Drazenovic R, Samsel RW, Wylam ME, Doerschuk CM, Schumacker PT (1992) Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *J Appl Physiol* 72:259-265.

70. Eckberg DL (1997) Sympathovagal balance: a critical appraisal. *Circulation* 96:3224-3232.

71. Erkens U, Scholz SE, Cordes T, Petzinger E, Hempelmann G (1998) Dopexamine impairs the Hepatic Cytokine Secretion after stimulation by Endotoxin via β -Receptor. 11th ESICM Annual Congress and 9th ESPIC Annual Congress, Stockholm, Sweden .

72. Estafanous FG, Brum JM, Ribeiro MP, Estafanous M, Starr N, Ferrario C (1992) Analysis of heart rate variability to assess hemodynamic alterations following induction of anesthesia. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 6:651-657.

73. Eversole RR, Smith SL, Beuving LJ, Hall ED (1993) Protective effect of the 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate (U74006F) on hepatic endothelium in experimental hemorrhagic shock. *Circ Shock* 40:125-131.

74. Fantone JC, Marasco WA, Elgas LJ, Ward PA (1984) Stimulus specificity of prostaglandin inhibition of rabbit polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release

and superoxide anion production. *Am J Pathol* 115:9-16.

75. Farquhar I, Martin CM, Lam C, Potter R, Ellis CG, Sibbald WJ (1996) Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J Surg Res* 61:190-196.

76. Fiebig E, Ley K, Arfors KE (1991) Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp* 10:127-144.

77. Fink MP, Antonsson JB, Wang HL, Rothschild HR (1991) Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. *Arch Surg* 126:211-218.

78. Fink MP, Heard SO (1990) Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49:186-196.

79. Fink MP, MacVittie TJ, Casey LC (1984) Inhibition of prostaglandin synthesis restores normal hemodynamics in canine hyperdynamic sepsis. *Ann Surg* 200:619-626.

80. Fish RE, Spitzer JA (1984) Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious, unrestrained rat: a unique model of chronic endotoxemia. *Circ Shock* 12:135-149.

81. Fisher-CJ J, Marra MN, Palardy JE, Marchbanks CR, Scott RW, Opal SM (1994) Human neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein reduces mortality rate from endotoxin challenge: a placebo-controlled study. *Crit Care Med* 22:553-558.

82. Fisher-CJ J, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL, et al (1993) Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 21:318-327.

83. Fleisher LA, Frank SM, Sessler DI, Cheng C, Matsukawa T, Vannier CA (1996) Thermoregulation and heart rate variability. *Clin Sci Colch* 90:97-103.

84. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD (1992) Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176:1665-1671.

85. Friedel N, Wenzel R, Matheis G, Kuppe H, Bittner H, Filcek S, Hetzer R (1992) Haemodynamic effects of different doses of dopexamine hydrochloride in low cardiac output states following cardiac surgery. *Eur Heart J* 13:1271-1276.

86. Frunder H, Hosenfelder H (1988) *Physiologische Chemie*. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 95-114.

-
87. Fukuda S, Yasu T, Predescu DN, Schmid-Schonbein GW (2000) Mechanisms for regulation of fluid shear stress response in circulating leukocytes. *Circ Res* 86:E13-E18.
 88. Fukumura D, Miura S, Kurose I, Higuchi H, Suzuki H, Ebinuma H, Han JY, Watanabe N, Wakabayashi G, Kitajima M, Ishii H (1996) IL-1 is an important mediator for microcirculatory changes in endotoxin-induced intestinal mucosal damage. *Dig Dis Sci* 41:2482-2492.
 89. Gärtner R, Angstwurm MW, Schottdorf J (1997) Selensubstitution bei Sepsispatienten. *Med Klin* 92 Suppl 3:12-14.
 90. Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P (1993) Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 265:H862-H867.
 91. Gaboury JP, Anderson DC, Kubes P (1994) Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Am J Physiol* 266:H637-H642.
 92. Ghosh S, Gray B, Oduro A, Latimer RD (1991) Dopexamine hydrochloride: pharmacology and use in low cardiac output states. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 5:382-389.
 93. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A (1993) Endotoxin-induced organ injury. *Crit Care Med* 21:S19-24.
 94. Godin PJ, Fleisher LA, Eidsath A, Vandivier RW, Preas HL, Banks SM, Buchman TG, Suffredini AF (1996) Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial. *Crit Care Med* 24:1117-1124.
 95. Goldberger JJ (1999) Sympathovagal balance: how should we measure it? *Am J Physiol* 276:H1273-H1280.
 96. Goldstein B, Kempinski MH, Stair D, Tipton RB, DeKing D, DeLong DJ, DeAsla R, Cox C, Lund N, Woolf PD (1995) Autonomic modulation of heart rate variability during endotoxin shock in rabbits. *Crit Care Med* 23:1694-1702.
 97. Goldstein DS, McCarty R, Polinsky RJ, Kopin IJ (1983) Relationship between plasma norepinephrine and sympathetic neural activity. *Hypertension* 5:552-559.
 98. Goldstein IM, Malmsten CL, Samuelsson B, Weissmann G (1977) Prostaglandins, thromboxanes, and polymorphonuclear leukocytes: mediation and modulation of inflammation. *Inflammation* 2:309-317.
 99. Golubinskaya V, Tarasova O, Borovik A, Rodionov I (1999) Low-frequency blood pressure oscillations in mesenteric vessels in conscious rats. *J Vasc Res* 36:528-531.
 100. Gonzalez AP, Sepulveda S, Massberg S, Baumeister R, Menger MD (1994) In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small

bowel transplants in rats. *Transplantation* 58:403-408.

101. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR (1995) Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 23:646-651.

102. Goode HF, Webster NR (1993) Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med* 21:1770-1776.

103. Gore RW, Bohlen HG (1977) Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi. *Am J Physiol* 233:H685-93.

104. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB (1989) Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 257:G683-G688.

105. Granger DN, Kubes P (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55:662-675.

106. Grant SM, Goa KL (1992) Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs* 43:889-924.

107. Gray PW, Corcorran AE, Eddy-RL J, Byers MG, Shows TB (1993) The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics* 15:188-190.

108. Grichois ML, Japundzic N, Head GA, Elghozi JL (1990) Clonidine reduces blood pressure and heart rate oscillations in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 16:449-454.

109. Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Priestersbach R, Bhakdi S, Suttrop N, Seeger W (1997) Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159:1909-1916.

110. Grisham MB, Everse J, Janssen HF (1988) Endotoxemia and neutrophil activation in vivo. *Am J Physiol* 254:H1017-H1022.

111. Grundmann HJ, Hahnle U, Hegenscheid B, Sahlmuller G, Bienzle U, Blitstein WE (1992) Inhibition of endotoxin-induced macrophage tumor necrosis factor expression by a prostacyclin analogue and its beneficial effect in experimental lipopolysaccharide intoxication. *J Infect Dis* 165:501-505.

112. Grune T, Siems WG, Kowalewski J, Esterbauer H (1994) Postischemic accumulation of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine. *Life Sci* 55:693-699.

113. Haber F, Weiss J (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron

salts. *Proc Roy Soc London [A]* 147:332-351.

114. Hales S (1733) *Statistical Essays: Containing Haemastatics*. Innys, Manby and Woodward, London, 2.

115. Hall ED (1993) Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann Emerg Med* 22:1022-1027.

116. Hall ED, McCall JM, Means ED (1994) Therapeutic potential of the lazaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage. *Adv Pharmacol* 28:221-268.

117. Hamburger SA, McCay PB (1989) Endotoxin-induced mortality in rats is reduced by nitrones. *Circ Shock* 29:329-334.

118. Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR (1991) Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352:342-344.

119. Hannemann L, Reinhart K, Meier HA, Bredle DL (1994) Prostacyclin in septic shock. *Chest* 105:1504-1510.

120. Hargrove DM, Bagby GJ, Lang CH, Spitzer JJ (1988) Adrenergic blockade prevents endotoxin-induced increases in glucose metabolism. *Am J Physiol* 255:E629-35.

121. Harlan JM (1985) Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 65:513-525.

122. Harlan JM (1987) Neutrophil-mediated vascular injury. *Acta Med Scand Suppl* 715:123-129.

123. Harris NR, Russell JM, Granger DN (1994) Mediators of endotoxin-induced leukocyte adhesion in mesenteric postcapillary venules. *Circ Shock* 43:155-160.

124. Hart BB, Stanford GG, Ziegler MG, Lake CR, Chernow B (1989) Catecholamines: study of interspecies variation. *Crit Care Med* 17:1203-1222.

125. Hasibeder W, Germann R, Wolf HJ, Haisjackl M, Hausdorfer H, Riedmann B, Bonatii J, Gruber E, Schwarz B, Waldenberger P, Friesenecker B, Furtner B (1996) Effects of short-term endotoxemia and dopamine on mucosal oxygenation in porcine jejunum. *Am J Physiol* 270:G667-G675.

126. Hatherill M, Tibby SM, Evans R, Murdoch IA (1998) Gastric tonometry in septic shock. *Arch Dis Child* 78:155-158.

127. Heinroth KM, Kuhn C, Stache N, Witthaut R, Müller-Werdan U, Werdan K, Prondzinsky R (1999) Eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität bei Patienten mit septischem und nicht septischem Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom. *Intensivmed* 36:436-445.

128. Hinshaw LB, Emerson TE, Iampietro PF, Brake CM (1962) A comparative study of the hemodynamic actions of histamine and endotoxin. *Am J Physiol* 203:600-606.

-
129. Hoffmann H, Markewitz A, Kreuzer E, Reichert K, Jochum M, Faist E (1998) Pentoxifylline decreases the incidence of multiple organ failure in patients after major cardiothoracic surgery. *Shock* 9:235-240.
130. Horgan MJ, Palace GP, Everitt JE, Malik AB (1993) TNF-alpha release in endotoxemia contributes to neutrophil-dependent pulmonary edema. *Am J Physiol* 264:H1161-H1165.
131. Howell SJ, Wanigasekera V, Young JD, Gavaghan D, Sear JW, Garrard CS (1995) Effects of propofol and thiopentone, and benzodiazepine premedication on heart rate variability measured by spectral analysis. *Br J Anaesth* 74:168-173.
132. Huang HH, Chan HL, Lin PL, Wu CP, Huang CH (1997) Time-frequency spectral analysis of heart rate variability during induction of general anaesthesia. *Br J Anaesth* 79:754-758.
133. Hurley J, McDonagh P, Cahill M, White M, Luke D, McGovern E, Phelan D (1995) The haemodynamic effect of prophylactic peri-operative dopexamine in coronary artery bypass patients. *Eur Heart J* 16:1705-1709.
134. Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
135. Immink WF, Beijer HJ, Charbon GA (1976) Hemodynamic effects of norepinephrine and isoprenaline in various regions of the canine splanchnic area. *Pflugers Arch* 365:107-118.
136. Iwai H, Morioka A, Shoya Y, Obata Y, Goto M, Kirisawa R, Okada H, Yoshino T (1998) Protective effect of passive immunization against TNF-alpha in mice infected with Sendai virus. *Exp Anim* 47:49-54.
137. Jünger M, Schlez A, Klyszcz T, Steins A, Hahn M (1999) Vasospasmolytic therapy in patients with SSC. *Adv Exp Med Biol* 455:305-307.
138. Jacobsen EJ, McCall JM, Ayer DE, Van-Doornik FJ, Palmer JR, Belonga KL, Braughler JM, Hall ED, Houser DJ, Krook MA (1990) Novel 21-aminosteroids that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma. *J Med Chem* 33:1145-1151.
139. Janssen GH, Tangelder GJ, oude Egbrink MG, Reneman RS (1994) Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals. *Am J Physiol* 267:H1199-H1204.
140. Janssen GH, Tangelder GJ, oude Egbrink MG, Reneman RS (1997) Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin. *Int J Microcirc Clin Exp* 17:305-

313.

141. Jin H, Yang R, Marsters SA, Bunting SA, Wurm FM, Chamow SM, Ashkenazi A (1994) Protection against rat endotoxic shock by p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor immunoadhesin: comparison with anti-TNF monoclonal antibody. *J Infect Dis* 170:1323-1326.

142. Jörres A, Dinter H, Topley N, Gahl GM, Frei U, Scholz P (1997) Inhibition of tumour necrosis factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: cellular mechanisms. *Cytokine* 9:119-125.

143. Johansson K, Jakobsson A, Lindahl K, Lindhagen J, Lundgren O, Nilsson GE (1991) Influence of fibre diameter and probe geometry on the measuring depth of laser Doppler flowmetry in the gastrointestinal application. *Int J Microcirc Clin Exp* 10:219-229.

144. Johnston TD, Hampton WW, Fry DE (1989) Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg* 46:101-103.

145. Jones CG, Titheradge MA (1993) The effect of treatment of the rat with bacterial endotoxin on gluconeogenesis and pyruvate metabolism in subsequently isolated hepatocytes. *Biochem J* 289:169-172.

146. Jones G, Hurley JV (1984) The effect of prostacyclin on the adhesion of leucocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol* 142:51-59.

147. Jones SB, Romano FD (1989) Dose- and time-dependent changes in plasma catecholamines in response to endotoxin in conscious rats. *Circ Shock* 28:59-68.

148. Julien C, Zhang ZQ, Cerutti C, Barres C (1995) Hemodynamic analysis of arterial pressure oscillations in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 50:239-252.

149. Jung S, Donhauser T, Toyka KV, Hartung HP (1997) Propentofylline and iloprost suppress the production of TNF-alpha by macrophages but fail to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Autoimmun* 10:519-529.

150. Just A, Wittmann U, Nafz B, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, Persson PB (1994) The blood pressure buffering capacity of nitric oxide by comparison to the baroreceptor reflex. *Am J Physiol* 267:H521-H527.

151. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Lindenmann J (1989) Allgemeine Bakteriologie, Morphologie und Feinstruktur der Bakterien. In E. Wiesmann (ed): Medizinische Mikrobiologie (Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie). Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, pp 73-81.

152. Kholoussy AM, Pollack D, Matsumoto T (1984) Prognostic significance of indocyanine green clearance in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 12:115-116.

-
153. Kieft H, Hoepelman AI, Zhou W, Rozenberg AM, Struyvenberg A, Verhoef J (1993) The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. Clinical observations. *Arch Intern Med* 153:2241-2247.
154. Kirton OC, Windsor J, Wedderburn R, Hudson CJ, Shatz DV, Mataragas NR, Civetta JM (1998) Failure of splanchnic resuscitation in the acutely injured trauma patient correlates with multiple organ system failure and length of stay in the ICU. *Chest* 113:1064-1069.
155. Klebanoff SJ (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 93:480-489.
156. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13:818-829.
157. Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB (1986) Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* 137:3189-3194.
158. Kretzschmar M (1994) Role of oxygen free radicals in the pathophysiology of sepsis. In: Reinhart K, Eyrich K (eds): *Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 122-135.
159. Kreymann G, Wolf M (1996) Geschichte und Definition der Sepsis - Brauchen wir eine neue Terminologie? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 31:9-14.
160. Kruse JA, Carlson RW (1990) Lactate measurement: plasma or blood? *Intensive Care Med* 16:1-2.
161. Krysztopik RJ, Bentley FR, Spain DA, Wilson MA, Garrison RN (1997) Lazaroid improves intestinal blood flow in the rat during hyperdynamic bacteraemia. *Br J Surg* 84:1717-1721.
162. Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP (1993) Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J* 7:1293-1299.
163. Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1990) Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 259:G859-64.
164. Kunitomo F, Morita T, Ogawa R, Fujita T (1987) Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. *Circ Shock* 21:15-22.
165. Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D (1988) Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* 263:5380-5384.
166. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN (1994) Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and

vascular protein leakage. *Circ Res* 74:336-343.

167. Kvernebo K, Staxrud LE, Salerud EG (1990) Assessment of human muscle blood perfusion with single-fiber laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res* 39:376-385.

168. Law WR, Ferguson JL (1988) Naloxone alters organ perfusion during endotoxin shock in conscious rats. *Am J Physiol* 255:H1106-H1113.

169. Le Gall J, Lemeshow S, Leleu G, Klar J, Huillard J, Rue M, Teres D, Artigas A (1995) Customized probability models for early severe sepsis in adult intensive care patients. Intensive Care Unit Scoring Group. *JAMA* 273:644-650.

170. Le Gall J, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957-2963.

171. Lehmann C (1994) Antioxidants in intestinal ischemia. *Phys Chem Biol Med* 1:83-88.

172. Lehmann C, Egerer K, Georgiew A, Weber M, Grune T, Kox WJ (1999) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha release in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G. *Crit Care Med* 27:1164-1167.

173. Lehmann C, Egerer K, Weber M, Krausch D, Wauer H, Newie T, Kox WJ (1997) Einfluss einer Selensubstitution auf verschiedene Laborparameter bei sepsisgefährdeten Patienten. *Med Klin* 92:14-16.

174. Lehmann C, Lewerenz A, Kreyer I, Luther B (1989) Effects of alpha 1-adrenoceptor blocker prazosin on microcirculation in terminal rabbit ileum. *Acta Chir Hung* 30:273-280.

175. Lehmann C, Luther B, Holzäpfel A, Roth S, David H, Grune T, Siems W, Bürger K, Kox WJ (1995) Perioperative vascular flushing perfusion in acute mesenteric artery occlusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 10:265-271.

176. Lehmann C, Luther B, Kox WJ (1996) Pharmakologische Beeinflussbarkeit des intestinalen Reperfusionsschadens im Tierexperiment. *Zentralbl Chir* 121:70-76.

177. Lehmann C, Luther B, Roder F (1989) Zur Hämodynamik der Intestinalarterien beim Hund unter besonderer Berücksichtigung der Flowverhältnisse. *Z Exp Chir Transplant Künstliche Organe* 22:97-104.

178. Lehmann C, Weber M, Krausch D, Wauer H, Newie T, Rohr U, Hensel M, Glatzel E, Priem F, Grune T, Kox WJ (1998) Parenteral selenium supplementation in critically ill patients - effects on antioxidant metabolism. *Z Ernährungswiss* 37:S106-109.

179. Leier CV (1988) Regional blood flow responses to vasodilators and inotropes in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 62:86E-93E.

180. Lelli JL, Drongowski RA, Gastman B, Remick DG, Coran AG (1993) Effects of coenzyme Q10 on the mediator cascade of sepsis. *Circ Shock* 39:178-187.

-
181. Lenhartz H (1903) Die septischen Erkrankungen. Hölder, Wien.
 182. Lentsch AB, Ward PA (1999) Activation and regulation of NFkappaB during acute inflammation. *Clin Chem Lab Med* 37:205-208.
 183. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1988) Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 82:2045-2055.
 184. Ley K (1992) Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *J Reconstr Microsurg* 8:495-503.
 185. Ley K (1994) Histamine can induce leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Am J Physiol* 267:H1017-H1023.
 186. Ley K, Tedder TF (1995) Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol* 155:525-528.
 187. Lo CJ, Fu M, Lo FR (1998) Prostaglandin I₂ analogue, iloprost, down regulates mitogen-activated protein kinases of macrophages. *J Surg Res* 76:159-164.
 188. Luther B, Lehmann C, Grune T, Meyer R, Schwenke G, Beutel H, Burger K (1999) Kontrollierte Reperfusion ischämischer Extremitätenmuskulatur zur Verminderung radikalischer Läsionen. *Zentralbl Chir* 124:336-343.
 189. Manasia A, Kang H, Hannon E, Lu Y, Oropello J, Leibowitz A, Stein J, Benjamin E (1997) Effects of the stable prostacyclin analogue iloprost on mesenteric blood flow in porcine endotoxic shock. *Crit Care Med* 25:1222-1227.
 190. Mannan M, Sooranna SR, Nel MR, Soni N (1998) Dopamine and Dopexamine inhibit Lippysaccharide-induced P-Selection Expression in isolated Neutrophils. 11th ESICM Annual Congress and 9th ESPIC Annual Congress, Stockholm, Sweden.
 191. Marra MN, Wilde CG, Griffith JE, Snable JL, Scott RW (1990) Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *J Immunol* 144:662-666.
 192. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL (1993) The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg* 218:111-119.
 193. Martin CM, Sibbald WJ (1994) Modulation of hemodynamics and organ blood flow by nitric oxide synthase inhibition is not altered in normotensive, septic rats. *Am J Respir Crit Care Med* 150:1539-1544.
 194. Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Leturcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, Ulevitch RJ (1992) Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal

and injured lungs. *J Clin Invest* 90:2209-2219.

195. Massberg S, Gonzalez AP, Leiderer R, Menger MD, Messmer K (1998) In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br J Surg* 85:127-133.

196. Matsuda T, Eccleston CA, Rubinstein I, Rennard SI, Joyner WL (1991) Antioxidants attenuate endotoxin-induced microvascular leakage of macromolecules in vivo. *J Appl Physiol* 70:1483-1489.

197. Mayer S (1876) Studien zur Physiologie des Herzens und der Blutgefäße, 5. Abhandlung: Über spontane Blutdruckschwankungen. *Sber Akad Wiss Wien* 74:281-307.

198. Maynard ND, Bihari DJ, Dalton RN, Smithies MN, Mason RC (1995) Increasing splanchnic blood flow in the critically ill. *Chest* 108:1648-1654.

199. Mayrovitz HN (1992) Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol* 262:H157-H161.

200. Mazerolles M, Senard JM, Verwaerde P, Tran MA, Montastruc JL, Virenque C, Montastruc P (1996) Effects of pentobarbital and etomidate on plasma catecholamine levels and spectral analysis of blood pressure and heart rate in dogs. *Fundam Clin Pharmacol* 10:298-303.

201. McKechnie K, Furman BL, Parratt JR (1986) Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats. *Circ Shock* 19:429-439.

202. Meier HA, Sakka S, Reinhart K (1999) Supportive therapy of the sepsis syndrome. *Clin Chem Lab Med* 37:333-339.

203. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519-522.

204. Mentz P, Mentz G, Giessler C, Mest HJ (1992) Interactions of prostanoids with the platelet activating factors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 47:13-16.

205. Minamiya Y, Abo S, Kitamura M, Izumi K, Kimura Y, Tozawa K, Saito S (1995) Endotoxin-induced hydrogen peroxide production in intact pulmonary circulation of rat. *Am J Respir Crit Care Med* 152:348-354.

206. Miura S, Imaeda H, Shiozaki H, Kurose I, Fukumura D, Tashiro H, Serizawa H, Suematsu M, Sekizuka E, Tsuchiya M (1993) Attenuation of endotoxin-induced intestinal microcirculatory damage by eicosapentanoic acid. *Am J Physiol* 264:G828-G834.

207. Miura S, Tsuzuki Y, Kurose I, Suematsu M, Shigematsu T, Kimura H, Higuchi H, Serizawa H, Yagita H, Okumura K, Granger DN, Ishii H (1996) Endotoxin stimulates

lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa. *Am J Physiol* 271:G282-G292.

208. Moazzam F, Delano FA, Zweifach BW, Schmid-Schoenbein GW (1997) The leukocyte response to fluid stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5338-5343.

209. Modig J (1988) Comparison of effects of dextran-70 and Ringer's acetate on pulmonary function, hemodynamics, and survival in experimental septic shock. *Crit Care Med* 16:266-271.

210. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM (1987) Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 213:23-28.

211. Morgan RA, Manning PB, Coran AG, Drongowski RA, Till GO, Ward PD, Oldham KT (1988) Oxygen free radical activity during live *E. coli* septic shock in the dog. *Circ Shock* 25:319-323.

212. Morita Y, Clemens MG, Miller LS, Rangan U, Kondo S, Miyasaka M, Yoshikawa T, Bulkley GB (1995) Reactive oxidants mediate TNF- α -induced leukocyte adhesion to rat mesenteric venular endothelium. *Am J Physiol* 269:H1833-H1842.

213. Mortality patterns USA (1999) *Morb Mortal Wkly Rep* 48:664-668.

214. Muller JM, Ziegler HH, Baeuerle PA (1993) Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 187:233-256.

215. Nafz B, Wagner CD, Persson PB (1997) Endogenous nitric oxide buffers blood pressure variability between 0.2 and 0.6 Hz in the conscious rat. *Am J Physiol* 272:H632-H637.

216. Nakayama M, Hasegawa N, Oka Y, Lutzke B, McCall JM, Raffin TA (1998) Effects of the lazaroid, tirilazad mesylate, on sepsis-induced acute lung injury in minipigs. *Crit Care Med* 26:538-547.

217. Navaratnam RL, Morris SE, Traber DL, Flynn J, Woodson L, Linares H, Herndon DN (1990) Endotoxin (LPS) increases mesenteric vascular resistance (MVR) and bacterial translocation (BT). *J Trauma* 30:1104-1113.

218. Nevriere RR, Pitt HM, Piper RD, Sibbald WJ, Potter RF (1999) Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats. *Am J Physiol* 276:G933-G940.

219. Nicolini FA, Mehta P, Lawson D, Mehta JL (1990) Reduction in human neutrophil chemotaxis by the prostacyclin analogue iloprost. *Thromb Res* 59:669-674.

220. Nöldge-Schomburg GF, Priebe HJ, Armbruster K, Pannen B, Haberstroh J, Geiger K (1996) Different effects of early endotoxaemia on hepatic and small intestinal oxygenation in

pigs. *Intensive Care Med* 22:795-804.

221. Novotny MJ, Laughlin MH, Adams HR (1988) Evidence for lack of importance of oxygen free radicals in *Escherichia coli* endotoxemia in dogs. *Am J Physiol* 254:H954-62.

222. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E (1986) Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 59:178-193.

223. Palmer RMJ (1993) The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg* 128:396-401.

224. Parati G, Saul JP, Di Rienzo M, Mancia G (1995) Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 25:1276-1286.

225. Parrillo JE (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328:1471-1477.

226. Pastor CM, Suter PM (1999) Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis. *Anesth Analg* 89:344-352.

227. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM (1991) Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112:749-759.

228. Pawlik WW, Shepherd AP, Mailman D, Shanbour LL, Jacobson ED (1976) Effects of dopamine and epinephrine on intestinal blood flow and oxygen uptake. *Adv Exp Med Biol* 75:511-516.

229. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R (1997) Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochem Pharmacol* 53:615-621.

230. Perretti M, Duncan GS, Flower RJ, Peers SH (1993) Serum corticosterone, interleukin-1 and tumour necrosis factor in rat experimental endotoxaemia: comparison between Lewis and Wistar strains. *Br J Pharmacol* 110:868-874.

231. Phan SH, Gannon DE, Ward PA, Karmiol S (1992) Mechanism of neutrophil-induced xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase conversion in endothelial cells: evidence of a role for elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:270-278.

232. Piepoli M, Garrard CS, Kontoyannis DA, Bernardi L (1995) Autonomic control of the heart and peripheral vessels in human septic shock. *Intensive Care Med* 21:112-119.

233. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E (1993) Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and

mortality. *Chest* 103:565-575.

234. Piper RD, Cook DJ, Bone RC, Sibbald WJ (1996) Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Crit Care Med* 24:2059-2070.

235. Powell RJ, Machiedo GW, Rush-BF J, Dikdan GS (1991) Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg* 57:86-88.

236. Pulletz S, Lehmann C, Volk T, Schmutzler M, Ziemer S, Kox WJ, Scherer RU (2000) Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia. *Crit Care Med* 28:2881-2886.

237. Quezado ZMN, Natanson C, Hoffmann WD (1994) Endotoxin in Septic Shock. In: Reinhart K, Eyrich K (eds): *Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 314-336.

238. Rabinovici R, Bugelski PJ, Esser KM, Hillegass LM, Vernick J, Feuerstein G (1993) ARDS-like lung injury produced by endotoxin in platelet- activating factor-primed rats. *J Appl Physiol* 74:1791-1802.

239. Radermacher P, Buhl R, Santak B, Klein M, Kniemeyer HW, Becker H, Tarnow J (1995) The effects of prostacyclin on gastric intramucosal pH in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 21:414-421.

240. Radetsky M (1996) The discovery of penicillin. *Pediatr Infect Dis J* 15:811-818.

241. Revelly JP, Ayuse T, Brienza N, Fessler HE, Robotham JL (1996) Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit Care Med* 24:1345-1351.

242. Revhaug A, Michie HR, Manson JM, Watters JM, Dinarello CA, Wolff SM, Wilmore DW (1988) Inhibition of cyclo-oxygenase attenuates the metabolic response to endotoxin in humans. *Arch Surg* 123:162-170.

243. Richardson RP, Rhyne CD, Fong Y, Hesse DG, Tracey KJ, Marano MA, Lowry SF, Antonacci AC, Calvano SE (1989) Peripheral blood leukocyte kinetics following in vivo lipopolysaccharide (LPS) administration to normal human subjects. Influence of elicited hormones and cytokines. *Ann Surg* 210:239-245.

244. Riva CM, Morganroth ML, Ljungman AG, Schoeneich SO, Marks RM, Todd RF, Ward PA, Boxer LA (1990) Iloprost inhibits neutrophil-induced lung injury and neutrophil adherence to endothelial monolayers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3:301-309.

245. Rosenthal EJ (1993) Epidemiologie von Septikämie-Erregern. Blutkulturstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. *Dtsch Med Wochenschr* 118:1269-1275.

246. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, Macarthur H, Misko TP

- (1999) Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 127:685-692.
247. Salzman AL, Wang H, Wollert PS, VanderMeer TJ, Compton CC, Denenberg AG, Fink MP (1994) Endotoxin-induced ileal mucosal hyperpermeability in pigs: role of tissue acidosis. *Am J Physiol* 66:G633-46.
248. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR (1997) Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA* 278:234-240.
249. Scalia R, Armstead VE, Minchenko AG, Lefer AM (1999) Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J Exp Med* 189:931-938.
250. Scheeren T, Susanto F, Reinauer H, Tarnow J, Radermacher P (1994) Prostacyclin improves glucose utilization in patients with sepsis. *J Crit Care* 9:175-184.
251. Scheffer GJ, Ten-Voorde BJ, Karemaker JM, Ros HH, de-Lange JJ (1993) Effects of thiopentone, etomidate and propofol on beat-to-beat cardiovascular signals in man. *Anaesthesia* 48:849-855.
252. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB (1993) Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Crit Care Med* 21:S92-102.
253. Schmid-Schoenbein GW, Zweifach BW, Kovalcheck S (1977) The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc Res* 14:303-317.
254. Schmidt H (1997) Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation und zum intestinalen Purinstoffwechsel bei Endotoxinämie. Habilitation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg .
255. Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Bach A, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E (1995) Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules. *Crit Care Med* 23:2008-2014.
256. Schmidt H, Schmidt W, Müller T, Böhrer H, Bach A, Gebhard MM, Martin E (1997) Effect of the 21-aminosteroid tirilazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia. *Surgery* 121:328-334.
257. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Böhrer H, Gebhard MM, Martin E (1996) Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J Surg Res* 61:521-526.
258. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Böhrer H, Martin E (1996) Dopexamine

maintains intestinal villus blood flow during endotoxemia in rats. *Crit Care Med* 24:1233-1237.

259. Schmidt W, Hacker A, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H (1998) Dopexamine attenuates endotoxin-induced microcirculatory changes in rat mesentery: role of beta2 adrenoceptors. *Crit Care Med* 26:1639-1645.

260. Schneider J, Friderichs E, Heintze K, Flohe L (1990) Effects of recombinant human superoxide dismutase on increased lung vascular permeability and respiratory disorder in endotoxemic rats. *Circ Shock* 30:97-106.

261. Schottmüller H (1914) Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandl dt Kongress Inn Med* 31:257-280.

262. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258.

263. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.

264. Schuster HP, K Werdan 2000 *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio, Springer.

265. Schuster JM, Nelson PS (2000) Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol* 67:767-773.

266. Semrad SD, Rose ML, Adams JL (1993) Effect of tirilazad mesylate (U74006F) on eicosanoid and tumor necrosis factor generation in healthy and endotoxemic neonatal calves. *Circ Shock* 40:235-242.

267. Shepherd AP, Riedel GL, Kiel JW, Haumschild DJ, Maxwell LC (1987) Evaluation of an infrared laser-Doppler blood flowmeter. *Am J Physiol* 252:G832-G839.

268. Shepherd AP, Riedel GL, Maxwell LC, Kiel JW (1984) Selective vasodilators redistribute intestinal blood flow and depress oxygen uptake. *Am J Physiol* 247:G377-G384.

269. Sibbald WJ, Vincent JL (1995) Round table conference on clinical trials for the treatment of sepsis. Brussels, March 12-14, 1994. *Intensive Care Med* 21:184-189.

270. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson WA, Seed B (1989) Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73:284-289.

271. Smith EF, Tempel GE, Wise WC, Halushka PV, Cook JA (1985) Experimental endotoxemia in the rat: efficacy of prostacyclin or the prostacyclin analog iloprost. *Circ*

Shock 16:1-7.

272. Smith GW, Hall JC, Farmer JB, Simpson WT (1987) The cardiovascular actions of dopexamine hydrochloride, an agonist at dopamine receptors and beta 2-adrenoceptors in the dog. *J Pharm Pharmacol* 39:636-641.
273. Smith ME, Gunther R, Gee M, Flynn J, Demling RH (1981) Leukocytes, platelets, and thromboxane A₂ in endotoxin-induced lung injury. *Surgery* 90:102-107.
274. Smithies M, Yee TH, Jackson L, Beale R, Bihari D (1994) Protecting the gut and the liver in the critically ill: effects of dopexamine. *Crit Care Med* 22:789-795.
275. Soong CV, Halliday MI, Hood JM, Rowlands BJ, Barros DA (1998) The use of tonometry to predict mortality in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 15:24-28.
276. Spies CD, Reinhart K, Witt I, Meier HA, Hannemann L, Bredle DL, Schaffartzik W (1994) Influence of N-acetylcysteine on indirect indicators of tissue oxygenation in septic shock patients: results from a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med* 22:1738-1746.
277. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434.
278. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
279. Statistisches Bundesamt (1999) Gesundheitsbericht für Deutschland. Metzler-Poeschel, Stuttgart.
280. Statistisches Landesamt Berlin (1999) Statistisches Jahrbuch Berlin 1999. Statistisches Landesamt, Berlin.
281. Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB (1999) Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 33:1359-1363.
282. Stauss HM, Mrowka R, Nafz B, Patzak A, Unger T, Persson PB (1995) Does low frequency power of arterial blood pressure reflect sympathetic tone? *J Auton Nerv Syst* 54:145-154.
283. Steeb GD, Wilson MA, Garrison RN (1992) Pentoxifylline preserves small-intestine microvascular blood flow during bacteremia. *Surgery* 112:756-763.
284. Steinberg S, Azar G, Love R, Lee R, Choe E, Flint L (1996) Dopexamine prevents depression of mesenteric blood flow caused by positive end-expiratory pressure in rats. *Surgery* 120:597-601.
285. Suba EA, McKenna TM, Williams TJ (1992) In vivo and in vitro effects of endotoxin on vascular responsiveness to norepinephrine and signal transduction in the rat. *Circ Shock*

36:127-133.

286. Sueishi K, Nanno S, Tanaka K (1981) Permeability enhancing and chemotactic activities of lower molecular weight degradation products of human fibrinogen. *Thromb Haemost* 45:90-94.

287. Suffredini AF (1994) Current prospects for the treatment of clinical sepsis. *Crit Care Med* 22:S12-S18.

288. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE (1989) The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 321:280-287.

289. Suzuki M, Suematsu M, Miura S, Oshio C, Oda M, Tsuchiya M (1988) Microcirculatory disturbances in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. The effects of heparin and gabexate mesilate on locomotive and metabolic changes of neutrophils. *Adv Exp Med Biol* 242:135-141.

290. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996) Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 17:354-381.

291. Temmesfeld-Wollbrück B, Szalay A, Mayer K, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F (1998) Abnormalities of Gastric Mucosal Oxygenation in Septic Shock. (Partial Responsiveness to Dopexamine). *Crit Care Med* 157:1586-1592.

292. Theuer CJ, Wilson MA, Steeb GD, Garrison RN (1993) Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. *Circ Shock* 40:61-68.

293. Thiel M, Zourelidis C, Peter K (1996) [The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS)] Die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten in der Pathogenese des akuten Lungenversagens (ARDS). *Anaesthesist* 45:113-130.

294. Tierschutzgesetz (1998) Bundesgesetzblatt. Bundesanzeiger Verlagsges. m.b.H., Bonn.

295. Tighe D, Moss R, Bennett D (1996) Cell surface adrenergic receptor stimulation modifies the endothelial response to SIRS. Systemic Inflammatory Response Syndrome. *New Horiz* 4:426-442.

296. Tonnesen MG (1989) Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* 93:53S-58S.

297. Traber DL, Flynn JT, Herndon DN, Redl H, Schlag G, Traber LD (1989) Comparison

of the cardiopulmonary responses to single bolus and continuous infusion of endotoxin in an ovine model. *Circ Shock* 27:123-138.

298. Friedman JK, Cohen RJ, Saul JP (1993) Mild hypovolemic stress alters autonomic modulation of heart rate. *Hypertension* 21:236-247.

299. Turner CR, Esser KM, Wheeldon EB (1993) Therapeutic intervention in a rat model of ARDS: IV. Phosphodiesterase IV inhibition. *Circ Shock* 39:237-245.

300. Uusaro A, Ruokonen E, Takala J (1995) Gastric mucosal pH does not reflect changes in splanchnic blood flow after cardiac surgery. *Br J Anaesth* 74:149-154.

301. Vallet B, Lund N, Curtis SE, Kelly D, Cain SM (1994) Gut and muscle tissue PO₂ in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *J Appl Physiol* 76:793-800.

302. Van Lambalgen AA, Rasker MT, van den Bos GC, Thijs LG (1988) Effects of endotoxemia on systemic plasma loss and hematocrit in rats. *Microvasc Res* 36:291-304.

303. Van Lambalgen AA, Runge HC, van den Bos GC, Thijs LG (1988) Regional lactate production in early canine endotoxin shock. *Am J Physiol* 254:E45-51.

304. VanderMeer TJ, Wang H, Fink MP (1995) Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit Care Med* 23:1217-1226.

305. Vary TC, Siegel JH, Nakatani T, Sato T, Aoyama H (1986) Effect of sepsis on activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 250:E634-40.

306. Vincent JL, Dufaye P, Berre J, Leeman M, Degaute JP, Kahn RJ (1983) Serial lactate determinations during circulatory shock. *Crit Care Med* 11:449-451.

307. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De-Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22:707-710.

308. Volk T, Gerst J, Faust BG, Stroehmann A, Kox WJ (1999) Monocyte stimulation by reactive oxygen species: role of superoxide and intracellular Ca²⁺. *Inflamm Res* 48:544-549.

309. Volk T, Hensel M, Schuster H, Kox WJ (2000) Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 206:105-112.

310. Volk T, Kox WJ (2000) Endothelium function in sepsis. *Inflamm Res* 49:185-198.

311. von Haller A (1760) *Elementa Physiologica*. Lausanne, 330.

312. Vongsavan N, Matthews B (1993) Some aspects of the use of laser Doppler flow

meters for recording tissue blood flow. *Exp Physiol* 78:1-14.

313. Wagner JG, Roth RA (1999) Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 66:10-24.

314. Walker HL, Mason AD, Raulston GL (1964) Surface infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Surg* 160:297-300.

315. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C (1995) Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 41:867-871.

316. Warner BW, Hasselgren PO, James JH, Bialkowska H, Rigel DF, Ogle C, Fischer JE (1987) Superoxide dismutase in rats with sepsis. Effect on survival rate and amino acid transport. *Arch Surg* 122:1142-1146.

317. Wayland H (1990) Intravital observatories. Dream or necessity. *Int J Microcirc Clin Exp* 9:1-19.

318. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189-200.

319. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach-CN J, Sunderman-FW J (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 33:214-220.

320. Woodruff PW, O'Carroll DI, Koizumi S, Fine J (1973) Role of the intestinal flora in major trauma. *J Infect Dis* 128:S4.

321. Wright SD, Ramos RA, Patel M, Miller DS (1992) Septin: a factor in plasma that opsonizes lipopolysaccharide-bearing particles for recognition by CD14 on phagocytes. *J Exp Med* 176:719-727.

322. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.

323. Xu D, Qi L, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deitch EA (1993) Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis. *J Trauma* 34:676-682.

324. Yamaki K, Lindbom L, Thorlacius H, Hedqvist P, Raud J (1998) An approach for studies of mediator-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 123:381-389.

325. Yoshikawa T, Takano H, Takahashi S, Ichikawa H, Kondo M (1994) Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure. *Circ Shock* 42:53-58.

326. Youn YK, LaLonde C, Demling R (1991) Use of antioxidant therapy in shock and trauma. *Circ Shock* 35:245-249.

-
327. Young JD, Cameron EM (1995) Dynamics of skin blood flow in human sepsis. *Intensive Care Med* 21:669-674.
328. Zabel P, Wolter DT, Schonharting MM, Schade UF (1989) Oxpentifylline in endotoxaemia. *Lancet* 2:1474-1477.
329. Zhang H, Spapen H, Manikis P, Rogiers P, Metz G, Buurman WA, Vincent JL (1995) Tirilazad mesylate (U-74006F) inhibits effects of endotoxin in dogs. *Am J Physiol* 268:H1847-H1855.
330. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Buurman WA, Vincent JL (1994) Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol* 266:H1746-H1754.
331. Ziegler E (1905) *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie*. Fischer Verlag, Jena.
332. Zimmerman BJ, Granger DN (1994) Oxygen Free Radicals and the Gastrointestinal Tract: Role in Ischemia-Reperfusion Injury. *Hepato-Gastroenterol* 41:337-342.
333. Zimmerman JE, Knaus WA, Wagner DP, Sun X, Hakim RB, Nystrom PO (1996) A comparison of risks and outcomes for patients with organ system failure: 1982-1990. *Crit Care Med* 24:1633-1641.
334. Zimmerman JJ (1994) Potential of Oxyradical Scavengers in the Therapy of Sepsis. In Reinhart K, Eyrich K (eds): *Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 414-424.
335. Zimmerman JJ (1995) Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med* 23:616-617.

9 Abkürzungsverzeichnis

A1 bzw. A3	Arteriolen ersten bzw. dritten Grades
AC	Wechselstrom
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ARDS	adult respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BPI	bactericidal permeability increasing protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CLP	coecal ligation and puncture
DC	Gleichstrom
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FCD	Funktionelle Kapillardichte
GPI	Glykophosphatidylinositol
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	high performance liquid chromatography
HZV	Herzzeitvolumen
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICG	Indocyanin-Grün
IMBF	intestinaler mikrovaskulärer Blutfluss
IVM	Intravitalmikroskopie
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LBP	lipopolysaccharid binding protein
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie
LDH	Laktatdehydrogenase
LEI	Leukozyten/Endothel-Interaktion
LPS	Lipopolysaccharid (Syn.: Endotoxin)
M	molar

MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MDA	Malondialdehyd
MEGX	Monoethylglycinxylylid
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NAC	N-Acetylcystein
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ^{-*}	Superoxidradikal
OH*	Hydroxylradikal
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
pH	pH-Wert
pH _i	intramukosaler pH-Wert
PMN	polymorphonukleäre Zellen
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck im Vollblut
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck im Vollblut
ROS	reactive oxygen species
sCD14	soluble CD14
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SEM	Standardfehler (engl.: standard error of mean)
SOD	Superoxiddismutase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V1 bzw. V3	Venolen ersten bzw. dritten Grades
XDH	Xanthindehydrogenase
XOD	Xanthinoxidase

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. W.J. Kox FRCP, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin am Campus Charité Mitte des Universitätsklinikum Charité, Berlin. Er gab die Anregung zur Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Durch seine intensive Förderung und Fürsprache konnten hervorragende Bedingungen für die Realisierung des Projektes geschaffen werden. Den Werdegang der Arbeit begleitete er stets konstruktiv und kritisch.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. K. Meßmer, Herrn PD Dr. T. Hoffmann und Herrn Dr. S. Maßberg vom Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich mich für die Unterstützung beim Aufbau der Intravitalmikroskopie bedanken. Neben der Möglichkeit der Hospitation gewährten sie mir einen fortwährenden wissenschaftlichen Kontakt, der außerordentlich hilfreich war. An der Charité stand mir bei intravitalmikroskopischen Fragen Herr Dr. H. Baatz aus der Klinik für Augenheilkunde mit Rat und Tat zur Seite.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. H. Stauss aus dem Institut für Physiologie der Charité für die Etablierung der Powerspektralanalyse von Blutdruck- und Laser-Doppler-Signalen. Uneigennützig half er bei der Konfiguration des Messplatzes und stellte die von ihm programmierte Software zur Verfügung.

Den Mitarbeitern der Charité Herrn Dr. Dr. K. Egerer und seiner Frau B. Egerer danke ich für die TNF- α -Bestimmungen, Herrn PD Dr. med. T. Grune und Frau M. Jackstedt für die MDA-Analysen sowie Herrn PD Dr. med. A. Lun und Dipl.-Chem. F. Priem für die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter.

Dank gilt auch dem Team der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie am Campus Charité Mitte, Frau Vet.-Ing. K. Führer, Frau A. Strobel und Frau B. Müller für die Betreuung der Versuchstiere.

Zu tiefem Dank verpflichtet bin ich meinem ersten wissenschaftlichen Mentor, Herrn Prof. Dr. Dr. B. Luther, Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Im Rahmen von Diplom- und Doktorarbeit vermittelte er mir die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens und war auch weiterhin ein freundschaftlicher Gesprächspartner.

Ich widme die vorliegende Arbeit meiner Frau Claudia und meinen Söhnen, die während langer Zeit auf vieles verzichten mussten.

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift